SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO8
No. 15-161783- -00000-0000
Fecha: 2015-07-13 16:47:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 9

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

T=F=8

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DIVISIONAl DE PATENTE DE INVENCIÓN

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 14-198149- -00004-0000
Fecha: 2015-07-13 16:47:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 9

TITULO: COMPOSICIONES DE NEISSERIA MENINGITIDIS Y MÉTODOS DE LAS MISMAS

SOLICITANTE: PFIZER INC.

EXPEDIENTE No. 14-198.149

DIRECCIÓN: 235 East 42nd Street, New York, New York 10017

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ: 13 de julio de 2015

P2014/000109A

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-198149- -00004-0000

Fecha: 2015-07-13 16:47:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 9

ARTEMOURE

TE MOURE & ASOCIAI

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO8

No. 15-161783- -00000-0000

Fecha: 2015-07-13 16:47:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 9

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DIVISIONAL DE PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL **P2014/000109A**

SOLICITUD DE:

(1) [X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

(2) **SOLICITANTE (71)**

Nombre: PFIZER INC.
Dirección: 235 East 42nd Street, New York, New York 10017
Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos
Lugar de Constitución: Estados Unidos
Teléfono: _____ **Fax:** _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN
C.C. [ ] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE
Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá, Colombia
Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799
E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN
C.C. [X] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA.
Dirección: VER PAGINA ADJUNTA.
Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA.

(5) **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/IB2013/051791 Fecha Marzo 06, 2013

Publicación Internacional No. WO2013/132452 Fecha Septiembre 12, 2013

(6) **Título (54) COMPOSICIONES DE NEISSERIA MENINGITIDIS Y MÉTODOS DE LAS MISMAS**

Clasificación Internacional (51) A61K 39/095

Prioridad **SI** [X] **NO** [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	Marzo 09,2012	61/609,257

(9) **Comprobante de pago No.** 15- **Fecha** _____

(10) **ANEXOS**

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [x] Declaraciones. Declaración bajo la Regla 417(ii) del PCT.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional 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.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [x] Otros. Búsqueda Internacional

(11) **FIGURA CARACTERÍSTICA:**

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-198149- -00004-0000

Fecha: 2015-07-13 16:47:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 9

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO8

No. 15-161783- -00000-0000

Fecha: 2015-07-13 16:47:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 9

3

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Tramite

[ ] Conversión [X] División [ ] Fusión

[X] Patente de Invención
[ ] Patente de Modelo de Utilidad

2. Datos del solicitante

[ ] Persona Natural [X] Persona Juridica

PFIZER INC.
Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa [ ] Micro [ ] Pequeña [ ] Mediana [ ] Otra

Documento de Identificación [ ] C.C. [ ] C.E. [X] NIT [ ] Otro Número

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Estados Unidos	235 East 42nd Street, New York, New York 10017	New York
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

[ ] **Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico**

3. Datos del apoderado:

CARLOS R. OLARTE	79.782.747 Bta	74.295
Apellidos y Nombre	Documento de identificación	Tarjeta profesional

Dirección y domicilio	Dirección del titular	Ciudad
Carrera 5 No 34-03 Bogotá D.C.		
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
office@moure.com	601-7799	601-7700

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

4. Datos del trámite:

CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente No.	Expediente No. 14-198.149	Expediente No.
De:	No. de divisionales	Expediente No.
A:		

5. Comprobante de Pago No		Fecha			

6. Anexos

X	Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
X	Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
X	Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
	Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
X	Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma

CARLOS R. OLARTE
Nombre y apellidos

Firma

79.782.747
C.C.

74.295
Tarjeta Profesional

14LISTA DE INVENTORES

PCT/IB2013/051791

Annaliesa Sybil ANDERSON
49 Hillcrest Drive,
Upper Saddle River,
New Jersey 07458
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Gran Bretaña

Susan Kay HOISETH
17 Coe Farm Road,
Montebello, New York 10901
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Kathrin Ute JANSEN
57 Heather Court Allendale,
New Jersey 07401
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Alemana

Justin Keith MORAN
682 Sierra Vista Lane,
Valley Cottage, New York 10989
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Mark E RUPPEN
6 Lea Court Garnerville,
New York 10923
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 0075605

Bogotá D.C., Julio 07 de 2015 - 12:45:30

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	601309030	06/07/2015	7.073.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION CONT. DERE	478.000.00	478.000.00
				$478.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-***-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO8

No. 15-161783- -00000-0000

Fecha: 2015-07-13 16:47:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 9

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-198149- -00004-0000

Fecha: 2015-07-13 16:47:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 9

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 0076149

Bogotá D.C., Julio 08 de 2015 - 11:28:34

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870 RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	66465	11/06/2015	132.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	73746	01/07/2015	96.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	75616	07/07/2015	286.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	75619	07/07/2015	530.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	75620	07/07/2015	530.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	75621	07/07/2015	530.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	75625	07/07/2015	530.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	75626	07/07/2015	308.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	32.000.00	32.000.00
				$32.000.00

SON: **TREINTA Y DOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO8

No. 15-161783- -00000-0000

Fecha: 2015-07-13 16:47:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 9

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-198149- -00004-0000

Fecha: 2015-07-13 16:47:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 9

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	**TESTIGO DOCUMENTAL**	Folio: 8

Dependencia Jerárquica: DELG. PROPIEDAD INDUSTRIAL		**Código**	2000
Dependencia Productora: GRUPO DE NUEVAS CREACIONES		**Código**	2020
Tipo de Radicación: Entrada: **X**	Salida: □	Traslado: □	Convenio: □
Radicador:			

DESCRIPCIÓN DE LA PRUEBA

Nombre de la Serie / Subserie:	Código:
Expediente: 14-198149-4 15-161783-0	Solicitante / ***Quejoso / Demandante / otros.***
Prueba excluida: cd.	
N°. de Pruebas excluidas: 1	
Fecha de emisión de la Prueba:	

UBICACIÓN DE LA PRUEBA EN LA SECCIÓN DE MATERIAL GRÁFICO

N°. de bloque:		Otras especificaciones:
Nº. de rodante:		
Nº. de estante:		
N°. de archivador:		
Nº. de entrepaño:		
Nº. de gaveta:		
N°. de caja:		

IMPORTANTE:

- El material gráfico ***o especial*** que se encuentra ***dentro o anexo a*** las unidades documentales o expedientes, debe extraerse y llevarse a aquella sección del archivo que se haya dispuesto para conservar documentos en distintos formatos.
- Entiéndase por material gráfico todos aquellos dibujos, croquis, mapas, planos, fotografías, ilustraciones, pictografías, códices, prensa, objetos tridimensionales, entre otros.

Observaciones:

El CD contiene 13 archivos en formato PDF procesados y cargados en el sistema.

Unidad de Conservación

- ○ Bolsa
- ○ Caja
- ○ Libro
- ○ Sobre
- ○ Tomo
- ○ Otro

Soporte Documental

- ✓ CD
- ○ Disquete
- ○ DVD
- ○ Folleto
- ○ Periódico
- ○ Plano
- ○ Publicación Periódica
- ○ USB
- ○ Otro

9

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 0077858

Bogotá D.C., Julio 13 de 2015 - 16:03:40

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	75607	07/07/2015	448.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
2	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	32.000.00	64.000.00
				$64.000.00

SON: **SESENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO8

No. 15-161783- -00000-0000

Fecha: 2015-07-13 16:47:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 9

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-198149- -00004-0000

Fecha: 2015-07-13 16:47:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 9

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Tramite

[ ] Conversión [X] División [ ] Fusión

[X] Patente de Invención
[ ] Patente de Modelo de Utilidad

2. Datos del solicitante

[ ] Persona Natural [X] Persona Juridica

PFIZER INC.
Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa [ ] Micro [ ] Pequeña [ ] Mediana [ ] Otra

Documento de Identificación [ ] C.C. [ ] C.E. [X] NIT [ ] Otro Número

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Estados Unidos	235 East 42nd Street, New York, New York 10017	New York
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

[ ] **Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico**

3. Datos del apoderado:

CARLOS R. OLARTE	79.782.747 Bta	74.295
Apellidos y Nombre	Documento de identificación	Tarjeta profesional

Dirección y domicilio	Dirección del titular	Ciudad
Carrera 5 No 34-03 Bogotá D.C.		
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
office@moure.com	601-7799	601-7700

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

4. Datos del trámite:

CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente No.	Expediente No. 14-198.149	Expediente No.
De:	No. de divisionales	Expediente No.
A:		

5. Comprobante de Pago No _____ **Fecha** | | | |

6. Anexos

X	Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
X	Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
X	Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
	Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
X	Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma

CARLOS R. OLARTE
Nombre y apellidos

Firma

79.782.747
C.C.

74.295
Tarjeta Profesional

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación.

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DIVISIONAL DE PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL **P2014/000109A**

SOLICITUD DE:

1

[X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

2

SOLICITANTE (71)

Nombre: PFIZER INC.

Dirección: 235 East 42nd Street, New York, New York 10017
Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos
Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: _____ **Fax:** _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. [ ] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá, Colombia
Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799
E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. [X] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA.

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA.

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2013/051791 Fecha Marzo 06, 2013

Publicación Internacional No. WO2013/132452 Fecha Septiembre 12, 2013

6

Título (54) COMPOSICIONES DE NEISSERIA MENINGITIDIS Y MÉTODOS DE LAS MISMAS

Clasificación Internacional (51) A61K 39/095

Prioridad

SI [X] **NO** [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	Marzo 09,2012	61/609,257

9

Comprobante de pago No. 15- **Fecha** _____

10 **ANEXOS**

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [x] Declaraciones. Declaración bajo la Regla 417(ii) del PCT.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional 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.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [x] Otros. Búsqueda Internacional

11 **FIGURA CARACTERÍSTICA:**

12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE FIRMA: _____

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/IB2013/051791

Annaliesa Sybil ANDERSON
49 Hillcrest Drive,
Upper Saddle River,
New Jersey 07458
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Gran Bretaña

Susan Kay HOISETH
17 Coe Farm Road,
Montebello, New York 10901
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Kathrin Ute JANSEN
57 Heather Court Allendale,
New Jersey 07401
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Alemana

Justin Keith MORAN
682 Sierra Vista Lane,
Valley Cottage, New York 10989
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Mark E RUPPEN
6 Lea Court Garnerville,
New York 10923
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

WK 4682687

ESCRITURA PUBLICA NUMERO ----- TRESCIENTOS VEINTIUNO (321).- ----------

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, República de Colombia, a los Veintitres - - - (23) días del mes de Marzo ----- del año dos mil siete (2007), ante mi, MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA ---------- NOTARIA(O) VEINTISIETE (27) DEL CIRCULO DE BOGOTA, ---se otorgó la escritura pública que se consigna en los siguientes términos: ----------

---

CLASE(S) DE ACTO: PROTOCOLIZACION: ----------

CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA - ----------

C.C. No. 79.782.747.----------

Se Dio 3 Copias 29 MAR. 2007

NOTARIA VEINTISIETE María Eugenia Rojas de Urueta

Compareció **CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA** mayor de edad, vecino de ésta ciudad, identificado con la cédula de ciudadanía número 79.782.747, obrando en su propio nombre y dijo: ----------

PRIMERO.- Que presenta para su protocolización y custodia en los archivos de ésta notaría, bajo el número y lugar que a ésta escritura corresponda, en seis (6) folios autenticados, el poder y sus traducciones el cual del siguiente tenor: ----------

PODER GENERAL.- ----------

El suscrito, PFIZER INC, domiciliado en 235 East 42nd Street, New York, New York 10017, USA, nombramos por el presente otorga a Olarte Raisbeck & Frieri Ltda. con oficinas en el World Trade Center- Torre A, Calle 100 No. 8ª-37, piso 10, Bogotá D.C. nuestros representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado a intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconvenciones; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la Ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses.-----

Firma (ilegible) Gregg C. Benson, Assistant General Counsel -----

Fecha: 20 February 2007.----------

Ciudad, Groton, Connecticut 06340 USA.----------

CERTIFICACION NOTARIAL ----------

En esta fecha,----------

el Notario Público suscrito certifica: ----------

Que GREGG C. BENSON mayor y domiciliado PFIZER INC., EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT 06340 USA

NOTARIO PUBLICO
(HAY SELLO ADHERIDO)

APOSTILLE
(Convención de la Haya, Octubre 5, 1961)

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. PAIS: Reino Unido de Gran Bretaña e irlanda del Norte
ESTE DOCUMENTO PUBLICO
2. HA SIDO FIRMADO POR **STEPHEN DAVID FINN**
3. ACTUANDO EN SU CALIDAD DE **NOTARIO PUBLIC**
4. LLEVA EL SELLO/ESTAMPILLA DE DICHO NOTARIO PUBLICO

CERTIFICADO

5. EN **LONDRES**
6. EL DIA **FEBRERO 27, 2007**
7. POR EL SECRETARIO PRINCIPAL DE ESTADO DE SU MAJESTAD PARA ASUNTOS EXTERIORES Y DE LA COMUNIDAD.
8. NR. **H303068**
9. SELLO/ESTAMPILLA
10. FIRMADO

O. WILLIAM
(HAY FIRMA)

Si este documento va a ser usado en un país no miembro de la Convención de La Haya de Octubre 5, 1961,debe ser presentado ante la sección consular de la misión representante de ese país. Una apostilla o certificado de legalización solamente confirma que la firma, sello o estampilla en el documento es auténtica. No significa que el contenido del documento sea correcto o que la Oficina de Extranjería de la Comunidad apruebe el contenido.

CERTIFICADO DE AUTENTICIDAD: El suscrito Traductor e Interprete Oficial juramentado, y debidamente registrado en el Ministerio de Relaciones Exteriores, con el presente certifica que esta es una traducción auténtica, verdadera, y precisa al Idioma Castellano, del documento en Inglés, **anexo.**

FIDEL ANTONIO MURCIA MURCIA

Traductor e Interprete Oficial
Resolución No. 488/94 Ministerio de Justicia

NOTARIA VEINTISIETE
María Eugenia Rojas de Urueta

TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RESOLUCION 488/94
MINJUSTICIA
FIDEL ANTONIO MURCIA MURCIA

BOGOTA DC. MARZO 12, 2007

TRADUCCIÓN OFICIAL LEGALIZACIONES EN PODER

(VERIFIQUE ANTES DE PROCEDER)

NOTA DE TRADUCCIÓN: SE TRATA DE UN PODER CONFERIDO POR **PFIZER INC** A **OLARTE RAISBECK & FRIERI LTD,** DE FECHA **FEB-20-2007**, SUSCRITO EN GROTON, CONNECTICUT, USA, EN IDIOMA CASTELLANO E INGLES, CON CERTIFICACIÓN NOTARIAL TAMBIEN EN INGLES Y CASTELLANO; Y CERTIFICACIÓN NOTARIAL Y APOSTILLE IN IDIOMA INGLES, CUYA TRADUCCIÓN ES LA SIGUIENTE:

SE INFORMA QUE YO, STEPHEN DAVID FINN DE 31 AMERSHAM HILL DRIVE HIGH WYCOMBE BUCKINGHAMSHIRE, REINO UNIDO, NOTARIO DEBIDAMENTE AUTORIZADO,

CERTIFICO SOLAMENTE QUE EL DOCUMENTO ANEXO AL PRESENTE TITULADO,

PODER, firmado por Gregg C Benson

En este día ha sido presentado a mi por Servicios Consulares Blair en nombre de su cliente Pfizer, y que dichos Servicios Consulares Blair han manifestado ante mi mediante tal presentación que su mencionado cliente ha manifestado ante ellos que el documento anexo es un documento original auténtico.

FIRMADO, y sellado en 31 Amersham Hill Drive antes mencionado, el 23 de Febrero 2007.

(HAY FIRMA)
STEPHEN FINN

TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RESOLUCION 488/94
MINJUSTICIA
FIDEL ANTONIO MURCIA MURCIA

BE IT KNOWN that I, STEPHEN DAVID FINN of 31 Amersham Hill Drive High Wycombe Buckinghamshire United Kingdom a duly authorised Notary Public

CERTIFY only that the document annexed hereto, namely:

GENERAL POWER signed by Gregg C. Benson.

has this day been presented to me by Blair Consular Services on behalf of their client Pfizer, and that the said Blair Consular Services have represented to me by such presentation that their said client has represented to them that the annexed document is an authentic original document.

SIGNED and sealed at 31 Amersham Hill Drive aforesaid on 23rd February 2007.

Stephen Finn
Notary Public

NOTARIA VEINTISIETE
María Eugenia Rojas de Urrutia

6396

APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
   Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

   This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by / a été signé par: **Stephen David Finn**

3. Acting in the capacity of / agissant en qualité de: **Notary Public**

4. Bears the seal/stamp of / est revêtu du sceau/timbre de: **The Said Notary Public**

5. at London/à Londres — Certified/Attesté

6. the/le **27 February 2007**

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs / par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No **H303068**

9. Stamp: / timbre:

10. Signature: **O Williams**

FOREIGN AND COMMONWEALTH OFFICE LONDON

For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.

OLARTERAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA.

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Ana María Frieri
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro

Zayde Chalhin
José Luis Londoño
Felipe Mendoza
Simón Salinas
Alexander Agudelo
Camilo A. Rodríguez

Of Counsel
Guillermo Chalhin
Graciela Melo
Jacqueline Chaparro
Cruz E. de Moncaleano

General Power

The undersigned,

PFIZER INC.

domiciled in

235 East 42nd Street, New York, New York 10017 USA

hereby appoint Olarte Raisbeck & Frieri Ltda. with offices in the World Trade Center – Torre A, Calle 100 No. 8A-37, Piso 10, Bogota D.C., legal representatives with faculties to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents in patent matters, who at the same time have the faculty to represent us before the administrative, judicial or police authorities of any hierarchy of the Republic of Colombia, the Republic of Bolivia, the Republic of Ecuador, the Republic of Peru, and the Bolivarian Republic of Venezuela, to initiate before said authorities all the necessary actions to accomplish said purposes and to intervene in all instances, grades and procedural levels; to file and prosecute applications, declarations, complaints, to claim, counterclaim, answer claims and counterclaims; to draw up specifications; to make amendments; oppositions and all types of objections and writings of any nature; cancellations and administrative injunction proceedings; to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive documents and monies; act as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to request preliminary injunctions of any nature, settle, make arrangements, to submit to arbitrators, to desist from claims or procedures, to accept claims, to collect, to ratify legal proceedings subscribed before the appointment and/or presentation of this Power, substitute or delegate the legal representation and other acts prescribed by law, in short, with all such further powers as may be required; to comply with all other requirements and, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests.

Poder General

El suscrito,

domiciliado en

nombramos por el presente a Olarte Raisbeck & Frieri Ltda. con oficinas en el World Trade Center – Torre A, Calle 100 No. 8A-37, Piso 10, Bogotá D.C., nuestros representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconvenciones; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses.

NOTARIA VEINTISIETE
María Eugenia Rojas de Urueta

Signature/Firma: _____

Gregg C. Benson, Assistant General Counsel

Date/Fecha: 20 February 2007

City,Country: Groton, Connecticut 06340 USA

OLARTERAISBECK
OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA.

MODEL OF NOTARIAL CERTIFICATION

Notarial Certification	**Certificación Notarial**
On this date, 20 February 2007 The undersigned Notary Public certifies:	En esta fecha, el Notario Público suscrito certifica:
1. That GREGG C. BENSON of legal age and domiciled in PFIZER INC., EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT 06340 USA signed the foregoing document.	1. Que mayor de edad y domiciliado suscribió el documento que antecede.
2. That the grantor has executed the foregoing document as ASSISTANT GENERAL COUNSEL OF PFIZER INC.	2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de de
3. That Pfizer Inc. having its principal place of business located in 235 East 42nd Street, New York, NY 10017 USA is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the General Power is granted are within the scope of its corporate purposes.	4. Que con sede principal ubicada en está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.
4. That the grantor has the authority to execute the General Power and that his/her representation is legal.	4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legitima.
5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s):	5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

NOTARY PUBLIC (Signature): Nancy M George

NANCY M. GEORGE
Notary Public
My Commission Expires 30 June 2011

WK 4682689

suscribió el documento que antecede. ---
2- Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de ----
4. Que con sede principal ubicada en.-----
está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.
4.- Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legitima.- ----------
5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3, y 4 fue la exhibición de (los) (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s): NANCY M. GEORGE Notary Public My commissión Expires 30 June 2001.- ----------
BOGOTA, MARZO 12, 2007- ----------
TRADUCCION OFICIAL LEGALIZACIONES EN PODER ----------
NOTA DE TRADUCCION: SE TRATA DE UN PODER CONFERIDO POR PFIZER INC A OLARTE RAISBECK & FRIERI LTD DE FECHA FEB-20-2007, SUSCRITO EN GROTON CONNECTICUT, USA, EN IDIOMA CASTELLANO E INGLES, CON CERTIFICACION NOTARIAL TAMBIEN EN INGLES Y CASTELLANO; Y CERTIFICACION NOTARIAL Y APOSTILLE IN IDIOMA INGLES, CUYA TRADUCCIÓN ES LA SIGUIENTE: ------
SE INFORMA QUE YO, STEPHEN DAVID FINN DE 31 AMERSHAM HILL DRIVE HIGH WYCOMBE BUCKINGHAMSHIRE, REINO UNIDO NOTARIO DEBIDAMENTE AUTORIZADO ----------
CERTIFICO SOLAMENTE QUE EL DOCUMENTO ANEXO AL PRESENTE TITUADO, ----------
PODER, firmado por Gregg C Benson----------
En este día ha sido presentado a mi por Servicios Consulares Blair en nombre de su cliente Pfizer, y que dichos Servicios Consulares

NOTARIA VEINTISIETE
María Eugenia Rojas de Urueta

REPUBLICA 2. María Eugen de Urdl NOTARIa Veinticiete de Sant

Blair han manifestado ante mi mediante tal presentación que su mencionado cliente ha manifestado ante ellos que el documento anexo es un documento original auténtico.----------

FIRMADO, y sellado en 31 Amersham Hill Drive antes mencionado, el 23 de Febrero 2007.----------

(HAY FIRMA) STEPHEN FINN NOTARIO PUBLICO (HAY SELLO ADHERIDO).- ----------

APOSTILLE

(Convención de la Haya, Octubre 5, 1961)

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e irlanda del Norte --------

ESTE DOCUMENTO PUBLICO

2. HA SIDO FIRMADO POR: STEPHEN DAVID FINN----------

3. ACTUANDO EN CALIDAD DE NOTARIO PUBLIC----------

4 LLEVA EL SELLO/ESTAMPILLA DE DICHO NOTARIO PUBLICO ----------

CERTIFICADO

5. EN LONDRES----------

6) EL DÍA FEBRERO 27, 2007 ---------- ----------

7. POR EL SECRETARIO PRINCIPAL DE ESTADO DE SU MAJESTAD PARA ASUNTOS EXTERIORES Y LA COMUNIDAD.-

8 NR.H303068 ----------

9. SELLO/ ESTAMPILLA: == ---------- ----------

10. Firmado O. WILLIAM (HAY FIRMA)----------

CERTIFICADO DE AUTENTICIDAD: El suscrito Traductor e Interprete Oficial juramentado, y debidamente registrado en el Ministerio de Relaciones Exteriores, con el presente certifica que esta es una traducción auténtica, verdadera, y precisa al Idioma Castellano, del documento en Inglés, anexo.----------

FIDEL ANTONIO MURCIA MURCIA Traductor e Interprete Oficial Resolución No. 488/94 Ministerio de Justicia (fdo. Fidel Murcia)".- ----------

WK 4682690

SEGUNDO.- Que solicita a la señora Notaria la incorporación de dichos documentos al protocolo de ésta notaría para que de su tenor se expidan las copias que más adelante se soliciten ------

---

El(los) compareciente(s) hace(n) constar que han verificado cuidadosamente sus nombres completos, estado(s) civil(es), los número(s) de sus documentos de identidad; Declara(n) que todas las informaciones consignadas en el presente instrumento son correctas y, en consecuencia, asumen la responsabilidad que se derive de cualquier inexactitud en los mismos. Conocen la ley y saben que el Notario responde de la regularidad formal de los instrumentos que autoriza, pero no de la veracidad de las declaraciones de los interesados.

NOTARIA VEINTISIETE
María Eugenia Rojas de Uribe

ADVERTENCIA, OTORGAMIENTO Y AUTORIZACION.- Leído el presente instrumento por el (los) compareciente (s) y advertido (s) sobre las formalidades legales, lo aprueban y firman conmigo y ante mí la(el) Notaria(o) quién lo autoriza. A los otorgantes se les advirtió finalmente que una vez firmado el presente instrumento, La(el) Notaria(o) no aceptará correcciones o modificaciones sino en la forma y casos previstos por la Ley. ---Se utilizaron las hojas de papel Notarial Nos: WK 4682687, WK 4682689, WK 4682690.- ----------

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

DERECHOS LEGALES: $ 38.110.oo

RESOLUCION 7880 DE 2006

IVA $ 12.078.oo

CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA

C.C.No. 79'782.747 Bta

TEL: 601-7700

MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA

NOTARIA(O) VENTISIETE (27) DE BOGOTA

REPUBLICA DE COLOMBIA
27
María Eugenia R3jas
de Urueta
NOTARIa
Notaría Veintisiete de Santafé

redb.

Es fiel y Sexta (6ª)
fotocopia de la Escritura Pública No. 321
de fecha 23 de Marzo de 2007
tomada de su original que expido en
Seis (6) hojas útiles de papel
común autorizado (Decreto1343 de 1970) con destino a
Interesado

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a 22 MAYO 2007
El Notario Veintisiete de Santafé de Bogotá.

REPUBLICA DE COLOMBIA
María Eugenia R8jas
de Urueta
NOTARIa
Notaría Veintisiete de Santafé de Bogotá

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

VIII-1-1	**Declaration: Identity of the Inventor** Declaration as to the identity of the inventor (Rules 4.17(i) and 51bis.1(a)(i))	In relation to this international application
	Name (LAST, First) Address	ANDERSON, Annaliesa Sybil of 49 Hillcrest Drive Upper Saddle River, New Jersey 07458 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
	Name (LAST, First) Address	HOISETH, Susan Kay of 17 Coe Farm Road Montebello, New York 10901 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
	Name (LAST, First) Address	JANSEN, Kathrin Ute of 57 Heather Court Allendale, New Jersey 07401 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
	Name (LAST, First) Address	MORAN, Justin Keith of 682 Sierra Vista Lane Valley Cottage, New York 10989 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
	Name (LAST, First) Address	RUPPEN, Mark E. of 6 Lea Court Garnerville, New York 10923 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

VIII-2-1	**Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent** Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application PFIZER INC. is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(iv)		an assignment from ANDERSON, Annaliesa Sybil to PFIZER INC., dated 29 June 2012 (29.06.2012)
VIII-2-1(iv)		an assignment from HOISETH, Susan Kay to PFIZER INC., dated 11 June 2012 (11.06.2012)
VIII-2-1(iv)		an assignment from JANSEN, Kathrin Ute to PFIZER INC., dated 26 June 2012 (26.06.2012)
VIII-2-1(iv)		an assignment from MORAN, Justin Keith to PFIZER INC., dated 09 July 2012 (09.07.2012)
VIII-2-1(iv)		an assignment from RUPPEN, Mark E. to PFIZER INC., dated 11 July 2012 (11.07.2012)

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

VIII-3-1	**Declaration: Entitlement to claim priority** Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	In relation to this international application PFIZER INC. is entitled to claim priority of earlier application No. 61/609,257 by virtue of the following:
VIII-3-1(iv)		an assignment from ANDERSON, Annaliesa Sybil to PFIZER INC., dated 29 June 2012 (29.06.2012)
VIII-3-1(iv)		an assignment from HOISETH, Susan Kay to PFIZER INC., dated 11 June 2012 (11.06.2012)
VIII-3-1(iv)		an assignment from JANSEN, Kathrin Ute to PFIZER INC., dated 26 June 2012 (26.06.2012)
VIII-3-1(iv)		an assignment from MORAN, Justin Keith to PFIZER INC., dated 09 July 2012 (09.07.2012)
VIII-3-1(iv)		an assignment from RUPPEN, Mark E. to PFIZER INC., dated 11 July 2012 (11.07.2012)

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
12 September 2013 (12.09.2013)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2013/132452 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 39/095 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/IB2013/051791

(22) International Filing Date:
6 March 2013 (06.03.2013)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/609,257 9 March 2012 (09.03.2012) US

(71) Applicant: **PFIZER INC.** [US/US]; 235 East 42nd Street, New York, New York 10017 (US).

(72) Inventors: **ANDERSON, Annaliesa Sybil**; 49 Hillcrest Drive, Upper Saddle River, New Jersey 07458 (US). **HOISETH, Susan Kay**; 17 Coe Farm Road, Montebello, New York 10901 (US). **JANSEN, Kathrin Ute**; 57 Heather Court, Allendale, New Jersey 07401 (US). **MORAN, Justin Keith**; 682 Sierra Vista Lane, Valley Cottage, New York 10989 (US). **RUPPEN, Mark E.**; 6 Lea Court, Garnerville, New York 10923 (US).

(74) Agent: **KLEIMAN, Gabriel L.**; Pfizer Inc., 235 East 42nd Street, New York, New York 10017 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— *as to the identity of the inventor (Rule 4.17(i))*

— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*

— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*

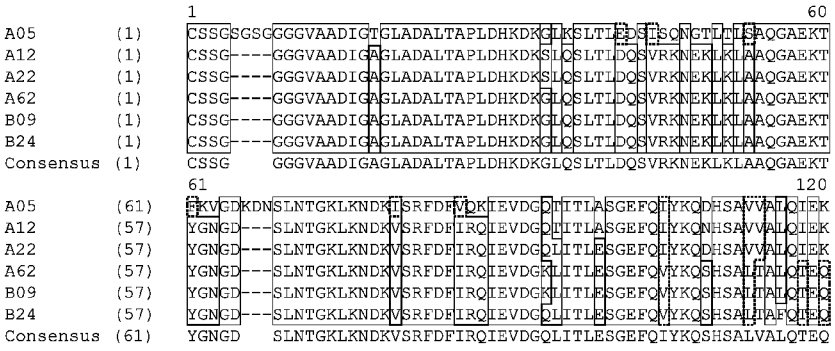
Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(54) Title: NEISSERIA MENINGITIDIS COMPOSITIONS AND METHODS THEREOF

FIG. 9A



(57) Abstract: In one aspect, the invention relates to an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence that is at least 95% identical to SEQ ID NO: 71. In another aspect, the invention relates to an immunogenic composition including an isolated non- lipidated, non-pyruvylated ORF2086 polypeptide from Neisseria meningitidis serogroup B, and at least one conjugated capsular saccharide from a meningococcal serogroup.

WO 2013/132452 A2

NEISSERIA MENINGITIDIS COMPOSITIONS AND METHODS THEREOF

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to *Neisseria meningitidis* compositions and methods thereof.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Neisseria meningitids is a Gram-negative encapsulated bacterium that can cause sepsis, meningitis and death. *N. meningitidis* can be classified into about 13 serogroups (including serogroups A, B, C, E29, H, I, K, L, W-135, X , Y and Z) based on chemically and antigenically distinctive polysaccharide capsules. Five of the serogroups (A, B, C, Y, and W135) are responsible for the majority of disease.

Meningococcal meningitis is a devastating disease that can kill children and young adults within hours despite the availability of antibiotics. There is a need for improved immunogenic compositions against meningococcal serogroups A, B, C, Y, and W135 and/or X.

SUMMARY OF THE INVENTION

To meet these and other needs, the present invention relates to *Neisseria meningitidis* compositions and methods thereof.

In one aspect, the invention relates to an isolated polypeptide including an amino acid sequence that is at least 95% identical to SEQ ID NO: 71, wherein the first twenty amino acid residues of the sequence does not contain a cysteine.

In one embodiment, the isolated polypeptide includes the amino acid sequence at positions 1-184 of SEQ ID NO: 71.

In one embodiment, the isolated polypeptide includes the amino acid sequence at positions 158-185 of SEQ ID NO: 71. In another embodiment, the isolated polypeptide includes the amino acid sequence at positions 159-186 of SEQ ID NO: 71.

In one embodiment, the isolated polypeptide includes at least 6 contiguous amino acids from the amino acid sequence at positions 185-254 of SEQ ID NO: 71.

In one embodiment, the isolated polypeptide is non-pyruvylated.

In one embodiment, the isolated polypeptide is non-lipidated.

In one embodiment, the isolated polypeptide is immunogenic.

In one embodiment, the isolated polypeptide includes the amino acid sequence consisting of the sequence set forth in SEQ ID NO: 71.

In one aspect, the invention relates to an isolated polypeptide including an amino acid sequence that is at least 95% identical to SEQ ID NO: 76, wherein the first twenty amino acid residues of the sequence does not contain a cysteine.

In one embodiment, the isolated polypeptide includes the amino acid sequence SEQ ID NO: 76.

In one embodiment, the isolated polypeptide includes the amino acid sequence SEQ ID NO: 76, wherein the cysteine at position 1 is deleted. In another embodiment, the isolated polypeptide includes the amino acid sequence SEQ ID NO: 76, wherein the cysteine at position 1 is substituted with an amino acid that is not a Cys residue. In one embodiment, the isolated polypeptide includes the amino acid sequence SEQ ID NO: 77.

In one embodiment, the isolated polypeptide is non-pyruvylated. In one embodiment, the isolated polypeptide is non-lipidated. In one embodiment, the isolated polypeptide is immunogenic.

In another aspect, the invention relates to an immunogenic composition including the polypeptide as in any of the embodiments aforementioned. In another aspect, the invention relates to an immunogenic composition including the polypeptide as in any of the embodiments described herein.

In one aspect, the invention relates to an isolated nucleic acid sequence encoding an isolated polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 71.

In one embodiment, the isolated nucleic acid sequence includes SEQ ID NO: 72.

In one aspect, the invention relates to an immunogenic composition including an isolated non-lipidated, non-pyruvylated ORF2086 polypeptide from *Neisseria meningitidis* serogroup B, and at least one conjugate selected from: a) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A; b) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C; c) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup W135; and d) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup Y.

In one embodiment, the immunogenic composition includes at least two conjugates selected from: a) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria*

meningitidis serogroup A; b) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C; c) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup W135; and d) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup Y.

In one embodiment, the immunogenic composition includes at least three conjugates selected from: a) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A; b) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C; c) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup W135; and d) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup Y.

In one embodiment, the immunogenic composition includes a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A; a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C; a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup W135; and a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup Y.

In one embodiment, the polypeptide is a subfamily A polypeptide.

In one embodiment, the polypeptide is a subfamily B polypeptide.

In one embodiment, the polypeptide is a non-pyruvylated non-lipidated A05.

In one embodiment, the polypeptide is a non-pyruvylated non-lipidated A12.

In one embodiment, the polypeptide is a non-pyruvylated non-lipidated A22.

In one embodiment, the polypeptide is a non-pyruvylated non-lipidated B01.

In one embodiment, the polypeptide is a non-pyruvylated non-lipidated B09.

In one embodiment, the polypeptide is a non-pyruvylated non-lipidated B44.

In one embodiment, the polypeptide is a non-pyruvylated non-lipidated B22.

In one embodiment, the polypeptide is a non-pyruvylated non-lipidated B24.

In one embodiment, the polypeptide is a non-pyruvylated non-lipidated A62.

In one embodiment, the polypeptide includes the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 71, and SEQ ID NO: 75. In one embodiment, the polypeptide includes the amino acid sequence SEQ ID NO: 77.

In one aspect, the invention relates to a method of inducing an immune response against *Neisseria meningitidis* in a mammal. The method includes administering to the mammal an effective amount of an immunogenic composition including an isolated non-

lipidated, non-pyruvylated ORF2086 polypeptide from *Neisseria meningitidis* serogroup B, and at least one conjugate selected from: a) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A; b) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C; c) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup W135; and d) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup Y.

In one aspect, the invention relates to a method of eliciting a bactericidal antibody against *Neisseria meningitidis* serogroup C in a mammal. The method includes administering to the mammal an effective amount of an immunogenic composition including an isolated non-lipidated, non-pyruvylated ORF2086 polypeptide from *Neisseria meningitidis* serogroup B.

In one embodiment, the polypeptide consists of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 71 or the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, and SEQ ID NO: 21, wherein the cysteine at position 1 is deleted. In another embodiment, the polypeptide includes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 76. In yet another embodiment, the cysteine at position 1 of the polypeptide is deleted. In a further embodiment, the polypeptide includes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 77.

In one embodiment, the immunogenic composition further includes at least one conjugate selected from: a) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A; b) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C; c) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup W135; and d) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup Y.

In one aspect, the invention relates to a method of eliciting a bactericidal antibody against *Neisseria meningitidis* serogroup Y in a mammal. The method includes administering to the mammal an effective amount of an immunogenic composition including an an isolated non-lipidated, non-pyruvylated ORF2086 polypeptide from *Neisseria meningitidis* serogroup B.

In one embodiment, the polypeptide consists of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 71 or the amino acid sequence selected from the group consisting

of SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, and SEQ ID NO: 21, wherein the cysteine at position 1 is deleted. In another embodiment, the polypeptide includes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 76. In yet another embodiment, the cysteine at position 1 of the polypeptide is deleted. In a further embodiment, the polypeptide includes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 77.

In one embodiment, the immunogenic composition further includes at least one conjugate selected from: a) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A; b) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C; c) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup W135; and d) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup Y.

In another aspect, the invention relates to a method of eliciting a bactericidal antibody against *Neisseria meningitidis* in a mammal, including administering to the mammal an effective amount of an immunogenic composition including an isolated non-lipidated, non-pyruvylated ORF2086 polypeptide from *Neisseria meningitidis* serogroup B, and at least one conjugate selected from: a) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A; b) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C; c) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup W135; and d) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup Y.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1: P2086 Variant Nucleic Acid Sequences.

Figure 2: P2086 Variant Amino Acid Sequences. The Gly/Ser stalk in the N-terminal tail of each variant is underlined.

Figure 3: Structure of the ORF2086 Protein

Figure 4: Removal of N-terminal Cys Results in Loss of Expression in *E. coli.*

Figure 5: Effect of Gly/Ser Stalk Length on Non-lipidated ORF2086 Variant Expression. The sequence associated with the protein variant labeled B01 is set forth in SEQ ID NO: 35. The sequence associated with the protein variant labeled B44 is set forth in SEQ ID NO: 36. The sequence associated with the protein variant labeled A05 is set forth in SEQ ID NO: 37. The sequence associated with the protein variant labeled A22 is set forth in SEQ ID NO: 38. The sequence associated with the protein variant labeled B22 is set forth in SEQ ID NO: 39. The sequence associated with the protein variant labeled A19 is set forth in SEQ ID NO: 40.

Figure 6: High Levels of Non-lipidated B09 Expression Despite A Short Gly/Ser Stalk. The left two lanes demonstrated expression of the N-terminal Cys-deleted B09 variant before and after induction. The third and fourth lanes demonstrate expression of the N-terminal Cys positive B09 variant before and after induction. The right most lane is a molecular weight standard. The amino acid sequence shown under the image is set forth in SEQ ID NO: 41. The nucleotide sequence representative of the N-terminal Cys-deleted A22 variant, referred to as "A22_001" in the figure, is set forth in SEQ ID NO: 42, which is shown under SEQ ID NO: 41 in the figure. The nucleotide sequence representative of the N-terminal Cys-deleted B22 variant, referred to as "B22_001" in the figure, is set forth in SEQ ID NO: 52. The nucleotide sequence representative of the N-terminal Cys-deleted B09 variant, referred to as "B09_004" in the figure, is set forth in SEQ ID NO: 53.

Figure 7: Codon Optimization Increases Expression of Non-lipidated B22 and A22 Variants. The left panel demonstrates expression of the N-terminal Cys-deleted B22 variant before (lanes 1 and 3) and after (lanes 2 and 4) IPTG induction. The right panel demonstrates expression of the N-terminal Cys-deleted A22 variant before (lane 7) and after (lane 8) IPTG induction. Lanes 5 and 6 are molecular weight standards.

Figure 8: P2086 Variant Nucleic and Amino Acid Sequences

Figure 9A-9B: Sequence alignment of selected wild-type subfamily A and B fHBP variants discussed in Examples 15-19. Note that the N-terminus of A62 is 100% identical to B09 and its C-terminus is 100% identical to A22. The sequences shown are A05 (SEQ ID NO: 13); A12 (SEQ ID NO: 14); A22 (SEQ ID NO: 15); A62 (SEQ ID NO: 70); B09 (SEQ ID NO: 18); B24 (SEQ ID NO: 20); and Consensus (SEQ ID NO: 78).

SEQUENCE IDENTIFIERS

SEQ ID NO: 1 sets forth a DNA sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant A04 gene, which includes a codon encoding an N-terminal Cys.

SEQ ID NO: 2 sets forth a DNA sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant A05 gene, which includes a codon encoding an N-terminal Cys.

SEQ ID NO: 3 sets forth a DNA sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant A12 gene, which includes a codon encoding an N-terminal Cys.

SEQ ID NO: 4 sets forth a DNA sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant A12-2 gene, which includes a codon encoding an N-terminal Cys.

SEQ ID NO: 5 sets forth a DNA sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant A22 gene, which includes a codon encoding an N-terminal Cys.

SEQ ID NO: 6 sets forth a DNA sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B02 gene, which includes a codon encoding an N-terminal Cys.

SEQ ID NO: 7 sets forth a DNA sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B03 gene, which includes a codon encoding an N-terminal Cys.

SEQ ID NO: 8 sets forth a DNA sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B09 gene, which includes a codon encoding an N-terminal Cys.

SEQ ID NO: 9 sets forth a DNA sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B22 gene, which includes a codon encoding an N-terminal Cys.

SEQ ID NO: 10 sets forth a DNA sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B24 gene, which includes a codon encoding an N-terminal Cys.

SEQ ID NO: 11 sets forth a DNA sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B44 gene, which includes a codon encoding an N-terminal Cys.

SEQ ID NO: 12 sets forth the amino acid sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant A04, which includes an N-terminal Cys at amino acid position 1.

SEQ ID NO: 13 sets forth the amino acid sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant A05, which includes an N-terminal Cys at amino acid position 1.

SEQ ID NO: 14 sets forth the amino acid sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant A12, which includes an N-terminal Cys at amino acid position 1.

SEQ ID NO: 15 sets forth the amino acid sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant A22, which includes an N-terminal Cys at amino acid position 1.

SEQ ID NO: 16 sets forth the amino acid sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B02, which includes an N-terminal Cys at amino acid position 1.

SEQ ID NO: 17 sets forth the amino acid sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B03, which includes an N-terminal Cys at amino acid position 1.

SEQ ID NO: 18 sets forth the amino acid sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B09, which includes an N-terminal Cys at amino acid position 1.

SEQ ID NO: 19 sets forth the amino acid sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B22, which includes an N-terminal Cys at amino acid position 1.

SEQ ID NO: 20 sets forth the amino acid sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B24, which includes an N-terminal Cys at amino acid position 1.

SEQ ID NO: 21 sets forth the amino acid sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B44, which includes an N-terminal Cys at amino acid position 1.

SEQ ID NO: 22 sets forth a DNA sequence for a forward primer, shown in Example 2.

SEQ ID NO: 23 sets forth a DNA sequence for a reverse primer, shown in Example 2.

SEQ ID NO: 24 sets forth a DNA sequence for a forward primer, shown in Example 2, Table 1.

SEQ ID NO: 25 sets forth a DNA sequence for a reverse primer, shown in Example 2, Table 1.

SEQ ID NO: 26 sets forth a DNA sequence for a forward primer, shown in Example 2, Table 1.

SEQ ID NO: 27 sets forth a DNA sequence for a reverse primer, shown in Example 2, Table 1.

SEQ ID NO: 28 sets forth a DNA sequence for a Gly/Ser stalk, shown in Example 4.

SEQ ID NO: 29 sets forth the amino acid sequence for a Gly/Ser stalk, shown in Example 4, which is encoded by, for example SEQ ID NO: 28.

SEQ ID NO: 30 sets forth a DNA sequence for a Gly/Ser stalk, shown in Example 4.

SEQ ID NO: 31 sets forth the amino acid sequence a Gly/Ser stalk, shown in Example 4, which is encoded by, for example SEQ ID NO: 30.

SEQ ID NO: 32 sets forth a DNA sequence for a Gly/Ser stalk, shown in Example 4.

SEQ ID NO: 33 sets forth the amino acid sequence for a Gly/Ser stalk, which is encoded by, for example, SEQ ID NO: 32 and SEQ ID NO: 34.

SEQ ID NO: 34 sets forth a DNA sequence for a Gly/Ser stalk, shown in Example 4.

SEQ ID NO: 35 sets forth the amino acid sequence for the N-terminus of *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B01, shown in Figure 5.

SEQ ID NO: 36 sets forth the amino acid sequence for the N-terminus of *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B44, shown in Figure 5.

SEQ ID NO: 37 sets forth the amino acid sequence for the N-terminus of *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant A05, shown in Figure 5.

SEQ ID NO: 38 sets forth the amino acid sequence for the N-terminus of *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant A22, shown in Figure 5.

SEQ ID NO: 39 sets forth the amino acid sequence for the N-terminus of *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B22, shown in Figure 5.

SEQ ID NO: 40 sets forth the amino acid sequence for the N-terminus of *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant A19, shown in Figure 5.

SEQ ID NO: 41 sets forth the amino acid sequence for the N-terminus of a *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant, shown in Figure 6.

SEQ ID NO: 42 sets forth a DNA sequence for the N-terminus of *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant A22, shown in Figure 6.

SEQ ID NO: 43 sets forth a codon-optimized DNA sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B44 gene, wherein the codon encoding an N-terminal cysteine is deleted, as compared to SEQ ID NO: 11. Plasmid pDK087 includes SEQ ID NO: 43.

SEQ ID NO: 44 sets forth the amino acid sequence for a non-lipidated *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B44. SEQ ID NO: 44 is identical to SEQ ID NO: 21 wherein the N-terminal cysteine at position 1 of SEQ ID NO: 21 is deleted. SEQ ID 44 is encoded by, for example, SEQ ID NO: 43.

SEQ ID NO: 45 sets forth a codon-optimized DNA sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B09 gene, wherein the codon encoding an N-terminal cysteine is deleted, and wherein the sequence includes codons encoding an additional Gly/Ser region, as compared to SEQ ID NO: 8. Plasmid pEB063 includes SEQ ID NO: 45.

SEQ ID NO: 46 sets forth a codon-optimized DNA sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B09 gene, wherein the codon encoding an N-terminal cysteine is deleted, as compared to SEQ ID NO: 8. Plasmid pEB064 includes SEQ ID NO: 46.

SEQ ID NO: 47 sets forth a codon-optimized DNA sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B09 gene, wherein the codon encoding an N-terminal cysteine is deleted, as compared to SEQ ID NO: 8. Plasmid pEB 065 includes SEQ ID NO: 47.

SEQ ID NO: 48 sets forth a DNA sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B09 gene, wherein the codon encoding an N-terminal cysteine is deleted, as compared to SEQ ID NO: 8. Plasmid pLA134 includes SEQ ID NO: 48.

SEQ ID NO: 49 sets forth the amino acid sequence for a non-lipidated *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B09. SEQ ID NO: 49 is identical to SEQ ID NO: 18 wherein the N-terminal cysteine at position 1 of SEQ ID NO: 18 is deleted. SEQ ID 49 is encoded by, for example, a DNA sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, and SEQ ID NO: 48.

SEQ ID NO: 50 sets forth the amino acid sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B09, wherein the codon encoding an N-terminal cysteine is deleted and wherein the sequence includes codons encoding an additional Gly/Ser region, as compared to SEQ ID NO: 18. SEQ ID NO: 50 is encoded by, for example, SEQ ID NO: 45.

SEQ ID NO: 51 sets forth a DNA sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B44 gene, wherein the codon encoding an N-terminal cysteine is deleted, as compared to SEQ ID NO: 11. Plasmid pLN056 includes SEQ ID NO: 51.

SEQ ID NO: 52 sets forth a DNA sequence for the N-terminus of *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B22, shown in Figure 6.

SEQ ID NO: 53 sets forth a DNA sequence for the N-terminus of *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B09, shown in Figure 6.

SEQ ID NO: 54 sets forth a DNA sequence for a *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant A05 gene, wherein the codon encoding an N-terminal cysteine is deleted, as compared to SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 55 sets forth the amino acid sequence for a non-lipidated *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant A05. SEQ ID NO: 55 is identical to SEQ ID NO: 13 wherein the N-terminal cysteine at position 1 of SEQ ID NO: 13 is deleted. SEQ ID NO: 55 is encoded by, for example, SEQ ID NO: 54.

SEQ ID NO: 56 sets forth the amino acid sequence of a serine-glycine repeat sequence, shown in Example 7.

SEQ ID NO: 57 sets forth the amino acid sequence for a non-lipidated *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B01. SEQ ID NO: 57 is identical to SEQ ID NO: 58 wherein the N-terminal cysteine at position 1 of SEQ ID NO: 58 is deleted.

SEQ ID NO: 58 sets forth the amino acid sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B01, which includes an N-terminal Cys at amino acid position 1.

SEQ ID NO: 59 sets forth the amino acid sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B15, which includes an N-terminal Cys at amino acid position 1.

SEQ ID NO: 60 sets forth the amino acid sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B16, which includes an N-terminal Cys at amino acid position 1.

SEQ ID NO: 61 sets forth a DNA sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B22, in which the codon for the N-terminal Cys at amino acid position 1 of SEQ ID NO: 19 is replaced with a codon for a Glycine.

SEQ ID NO: 62 sets forth the amino acid sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B22, in which the N-terminal Cys at amino acid position 1 of SEQ ID NO: 19 is replaced with a Glycine.

SEQ ID NO: 63 sets forth a DNA sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant A22, in which the codon for the N-terminal Cys at amino acid position 1 of SEQ ID NO: 15 is replaced with a codon for a Glycine.

SEQ ID NO: 64 sets forth the amino acid sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant A22, in which the N-terminal Cys at amino acid position 1 of SEQ ID NO: 15 is replaced with a Glycine.

SEQ ID NO: 65 sets forth a codon-optimized DNA sequence (pEB042) encoding a non-lipidated, non-pyruvylated A05 polypeptide.

SEQ ID NO: 66 sets forth the amino acid sequence for a non-lipidated *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant A12. SEQ ID NO: 66 is identical to SEQ ID NO: 14 wherein the N-terminal cysteine at position 1 of SEQ ID NO: 14 is deleted. SEQ ID NO: 66 is encoded by, for example, SEQ ID NO: 67.

SEQ ID NO: 67 sets forth a codon-optimized DNA sequence for a non-lipidated, non-pyruvylated A12 polypeptide.

SEQ ID NO: 68 sets forth the amino acid sequence for a non-lipidated *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant A22. SEQ ID NO: 68 is identical to SEQ ID NO: 15 wherein the N-terminal cysteine at position 1 of SEQ ID NO: 15 is deleted. SEQ ID NO: 68 is encoded by, for example, SEQ ID NO: 69.

SEQ ID NO: 69 sets forth a codon-optimized DNA sequence for a non-lipidated, non-pyruvylated A22 polypeptide.

SEQ ID NO: 70 sets forth the amino acid sequence for the *N. meningitidis* serogroup B, 2086 variant A62, which includes an N-terminal Cys at amino acid position 1.

SEQ ID NO: 71 sets forth the amino acid sequence for a non-lipidated *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant A62. SEQ ID NO: 71 is identical to SEQ ID NO: 70 wherein the N-terminal cysteine at position 1 of SEQ ID NO: 70 is deleted.

SEQ ID NO: 72 sets forth a codon-optimized DNA sequence for SEQ ID NO: 71.

SEQ ID NO: 73 sets forth a codon-optimized DNA sequence (pDK086) for a *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant A05 gene, wherein the codon encoding an N-terminal cysteine is deleted, as compared to SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 74 sets forth the amino acid sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant A29, which includes an N-terminal Cys at amino acid position 1.

SEQ ID NO: 75 sets forth the amino acid sequence for a non-lipidated *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B22. SEQ ID NO: 75 is identical to SEQ ID NO: 19 wherein the N-terminal cysteine at position 1 of SEQ ID NO: 19 is deleted.

SEQ ID NO: 76 sets forth the amino acid sequence for a *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant A05.

SEQ ID NO: 77 sets forth the amino acid sequence for a non-lipidated *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant A05. SEQ ID NO: 77 is identical to SEQ ID NO: 19 wherein the N-terminal cysteine at position 1 of SEQ ID NO: 76 is not present.

SEQ ID NO: 78 sets forth the amino acid sequence for a consensus sequence shown in FIG. 9A-9B.
SEQ ID NO: 79 is identical to SEQ ID NO: 78 except that the Cys at position 1 of SEQ ID NO: 78 is not present.

SEQ ID NO: 80 sets forth the amino acid sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B24. SEQ ID NO: 80 is identical to SEQ ID NO: 20 wherein the N-terminal cysteine at position 1 of SEQ ID NO: 20 is deleted.

SEQ ID NO: 81 sets forth the amino acid sequence for the *N. meningitidis*, serogroup B, 2086 variant B24. SEQ ID NO: 81 is identical to SEQ ID NO: 20 wherein the residues at positions 1-3 of SEQ ID NO: 20 are deleted.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as those commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, suitable methods and materials are described below. The materials, methods and examples are illustrative only, and are not intended to be limiting. All publications, patents and other documents mentioned herein are incorporated by reference in their entirety.

Definitions

The term "antigen" generally refers to a biological molecule, usually a protein, peptide, polysaccharide, lipid or conjugate which contains at least one epitope to which a cognate antibody can selectively bind; or in some instances to an immunogenic substance that can stimulate the production of antibodies or T-cell responses, or both, in an animal, including compositions that are injected or absorbed into an animal. The immune response may be generated to the whole molecule, or to one or more various portions of the molecule (*e.g.*, an epitope or hapten). The term may be used to refer to an individual molecule or to a homogeneous or heterogeneous population of antigenic molecules. An antigen is recognized by antibodies, T-cell receptors or other elements of specific humoral and/or cellular immunity. The term "antigen" includes all related antigenic epitopes. Epitopes of a given antigen can be identified using any number of epitope mapping techniques, well known in the art. See, *e.g.*, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, N. J. For example, linear epitopes may be determined by *e.g.*, concurrently synthesizing large numbers of peptides on solid supports, the peptides corresponding to portions of the protein molecule, and reacting the peptides with antibodies while the peptides are still attached to the supports. Such techniques are known in the art and described in, *e.g.*, U.S. Pat. No. 4,708,871; Geysen et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002; Geysen et al. (1986) *Molec. Immunol.* 23:709-715, all incorporated herein by reference in their entireties. Similarly, conformational epitopes may be identified by determining spatial conformation of amino acids such as by, *e.g.*, x-ray crystallography and 2-dimensional nuclear magnetic

resonance. See, *e.g.*, Epitope Mapping Protocols, *supra*. Furthermore, for purposes of the present invention, an "antigen" may also be used to refer to a protein that includes modifications, such as deletions, additions and substitutions (generally conservative in nature, but they may be non-conservative), to the native sequence, so long as the protein maintains the ability to elicit an immunological response. These modifications may be deliberate, as through site-directed mutagenesis, or through particular synthetic procedures, or through a genetic engineering approach, or may be accidental, such as through mutations of hosts, which produce the antigens. Furthermore, the antigen can be derived, obtained, or isolated from a microbe, *e.g.* a bacterium, or can be a whole organism. Similarly, an oligonucleotide or polynucleotide, which expresses an antigen, such as in nucleic acid immunization applications, is also included in the definition. Synthetic antigens are also included, for example, polyepitopes, flanking epitopes, and other recombinant or synthetically derived antigens (Bergmann et al. (1993) *Eur. J. Immunol.* 23:2777 2781; Bergmann et al. (1996) *J. Immunol.* 157:3242 3249; Suhrbier, A. (1997) *Immunol. and Cell Biol.* 75:402 408; Gardner et al. (1998) 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, Jun. 28 - Jul. 3, 1998).

The term "conservative" amino acid substitutions may be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipathic nature of the residues involved. For example, non-polar (hydrophobic) amino acids include alanine, leucine, isoleucine, valine, proline, tryptophan, and methionine; polar/neutral amino acids include glycine, serine, threonine, cysteine, tyrosine, asparagine, and glutamine; positively charged (basic) amino acids include arginine, lysine, and histidine; and negatively charged (acidic) amino acids include aspartic acid and glutamic acid. In some embodiments, the conservative amino acid changes alter the primary sequence of the ORF2086 polypeptides, but do not alter the function of the molecule. When generating these mutants, 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 & Doolittle, 1982, J. Mol. Biol., 157(1):105-32). It is known that certain amino acids can be substituted for other amino acids having a similar hydropathic index or score and still result in a polypeptide with similar biological activity. Each amino acid has been assigned a hydropathic index on the basis of its hydrophobicity and charge characteristics. Those indices are: isoleucine (+4.5); valine (+4.2); leucine (+3.8);

phenylalanine (+2.8); cysteine/cystine (+2.5); methionine (+1.9); alanine (+1.8); glycine (-0.4); threonine (-0.7); serine (-0.8); tryptophan (-0.9); tyrosine (-1.3); proline (-1.6); histidine (-3.2); glutamate (-3.5); glutamine (-3.5); aspartate (-3.5); asparagine (-3.5); lysine (-3.9); and arginine (-4.5).

It is believed that the relative hydropathic character of the amino acid residue determines the secondary and tertiary structure of the resultant polypeptide, which in turn defines the interaction of the polypeptide with other molecules, such as enzymes, substrates, receptors, antibodies, antigens, and the like. It is known in the art that an amino acid can be substituted by another amino acid having a similar hydropathic index and still obtain a functionally equivalent polypeptide. In such changes, the substitution of amino acids whose hydropathic indices are within +/-2 is preferred, those within +/-1 are particularly preferred, and those within +/-0.5 are even more particularly preferred.

Conservative amino acids substitutions or insertions can also be made on the basis of hydrophilicity. As described in U.S. Pat. No. 4,554,101, which is hereby incorporated by reference the greatest local average hydrophilicity of a polypeptide, as governed by the hydrophilicity of its adjacent amino acids, correlates with its immunogenicity and antigenicity, *i.e.*, with a biological property of the polypeptide. U.S. Pat. No. 4,554,101reciates that the following hydrophilicity values have been assigned to amino acid residues: arginine (+3.0); lysine (+3.0); aspartate (+3.0±1); glutamate (+3.0±1); serine (+0.3); asparagine (+0.2); glutamine (+0.2); glycine (0); proline (-0.5±1); threonine (-0.4); alanine (-0.5); histidine (-0.5); cysteine (-1.0); methionine (-1.3); valine (-1.5); leucine (-1.8); isoleucine (-1.8); tyrosine (-2.3); phenylalanine (-2.5); tryptophan (-3.4). It is understood that an amino acid can be substituted for another having a similar hydrophilicity value and still obtain a biologically equivalent, and in particular, an immunologically equivalent polypeptide. In such changes, the substitution of amino acids whose hydrophilicity values are within ±2 is preferred; those within ±1 are particularly preferred; and those within ±0.5 are even more particularly preferred. Exemplary substitutions which take various of the foregoing characteristics into consideration are well known to those of skill in the art and include, without limitation: arginine and lysine; glutamate and aspartate; serine and threonine; glutamine and asparagine; and valine, leucine and isoleucine.

The term "effective immunogenic amount" as used herein refers to an amount of a polypeptide or composition comprising a polypeptide which is effective in eliciting an

immune response in a vertebrate host. For example, an effective immunogenic amount of a rLP2086 protein of this invention is an amount that is effective in eliciting an immune response in a vertebrate host. The particular "effective immunogenic dosage or amount" will depend upon the age, weight and medical condition of the host, as well as on the method of administration. Suitable doses are readily determined by persons skilled in the art.

The term "Gly/Ser stalk" as used herein refers to the series of Gly and Ser residues immediately downstream of the N-terminal Cys residue of a protein encoded by ORF2086. There can be between 5 and 12 Gly and Ser residues in the Gly/Ser stalk. Accordingly, the Gly/Ser stalk consists of amino acids 2 to between 7 and 13 of the protein encoded by ORF2086. Preferably, the Gly/Ser stalk consists of amino acids 2 and up to between 7 and 13 of the protein encoded by ORF2086. The Gly/Ser stalks of the P2086 variants of the present invention are represented by the underlined sequences in Figure 2 (SEQ ID NO: 12-21). As shown herein, the length of the Gly/Ser stalk can affect the stability or expression level of a non-lipidated P2086 variant. In an exemplary embodiment, effects from affecting the length of the Gly/Ser stalk are compared to those from the corresponding wild-type variant.

The term "immunogenic" refers to the ability of an antigen or a vaccine to elicit an immune response, either humoral or cell-mediated, or both.

An "immunogenic amount", or an "immunologically effective amount" or "dose", each of which is used interchangeably herein, generally refers to the amount of antigen or immunogenic composition sufficient to elicit an immune response, either a cellular (T cell) or humoral (B cell or antibody) response, or both, as measured by standard assays known to one skilled in the art.

The term "immunogenic composition" relates to any pharmaceutical composition containing an antigen, *e.g.* a microorganism, or a component thereof, which composition can be used to elicit an immune response in a subject. The immunogenic compositions of the present invention can be used to treat a human susceptible to *N. meningidis* infection, by means of administering the immunogenic compositions via a systemic transdermal or mucosal route. These administrations can include injection via the intramuscular (i.m.), intraperitoneal (i.p.), intradermal (i.d.) or subcutaneous routes; application by a patch or other transdermal delivery device; or via mucosal administration to the oral/alimentary, respiratory or genitourinary tracts. In one

embodiment, the immunogenic composition may be used in the manufacture of a vaccine or in the elicitation of a polyclonal or monoclonal antibodies that could be used to passively protect or treat a subject.

Optimal amounts of components for a particular immunogenic composition can be ascertained by standard studies involving observation of appropriate immune responses in subjects. Following an initial vaccination, subjects can receive one or several booster immunizations adequately spaced.

The term "isolated" means that the material is removed from its original environment (*e.g.*, the natural environment if it is naturally occurring or from it's host organism if it is a recombinant entity, or taken from one environment to a different environment). For example, an "isolated" protein or peptide is substantially free of cellular material or other contaminating proteins from the cell or tissue source from which the protein is derived, or substantially free of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized, or otherwise present in a mixture as part of a chemical reaction. In the present invention, the proteins may be isolated from the bacterial cell or from cellular debris, so that they are provided in a form useful in the manufacture of an immunogenic composition. The term "isolated" or "isolating" may include purifying, or purification, including for example, the methods of purification of the proteins, as described herein. The language "substantially free of cellular material" includes preparations of a polypeptide or protein in which the polypeptide or protein is separated from cellular components of the cells from which it is isolated or recombinantly produced. Thus, a protein or peptide that is substantially free of cellular material includes preparations of the capsule polysaccharide, protein or peptide having less than about 30%, 20%, 10%, 5%, 2.5%, or 1%, (by dry weight) of contaminating protein or polysaccharide or other cellular material. When the polypeptide/protein is recombinantly produced, it is also preferably substantially free of culture medium, i.e., culture medium represents less than about 20%, 10%, or 5% of the volume of the protein preparation. When polypeptide or protein is produced by chemical synthesis, it is preferably substantially free of chemical precursors or other chemicals, i.e., it is separated from chemical precursors or other chemicals which are involved in the synthesis of the protein or polysaccharide. Accordingly, such preparations of the polypeptide or protein have less than about 30%, 20%, 10%, 5% (by dry weight) of

chemical precursors or compounds other than polypeptide/protein or polysaccharide fragment of interest.

The term "N-terminal tail" as used herein refers to the N-terminal portion of a protein encoded by ORF2086, which attaches the protein to the cell membrane. An N-terminal tail is shown at the bottom of the side view structure in Figure 3. An N-terminal tail typically comprises the N-terminal 16 amino acids of the protein encoded by ORF2086. In some embodiments, the N-terminal tail is amino acids 1-16 of any one of SEQ ID NOs: 12-21.The term "ORF2086" as used herein refers to Open Reading Frame 2086 from a *Neisseria* species bacteria. *Neisseria* ORF2086, the proteins encoded therefrom, fragments of those proteins, and immunogenic compositions comprising those proteins are known in the art and are described, e.g., in WO2003/063766, and in U.S. Patent Application Publication Nos. US 20060257413 and US 20090202593, each of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

The term “P2086” generally refers to the protein encoded by ORF2086. The “P” before “2086” is an abbreviation for “protein.” The P2086 proteins of the invention may be lipidated or non-lipidated. “LP2086” and “P2086” typically refer to lipidated and non-lipidated forms of a 2086 protein, respectively. The P2086 protein of the invention may be recombinant. “rLP2086” and “rP2086” typically refer to lipidated and non-lipidated forms of a recombinant 2086 protein, respectively. “2086” is also known as factor H-binding protein (fHBP) due to its ability to bind to factor H.

The term "pharmaceutically acceptable diluent, excipient, and/or carrier" as used herein is intended to include any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like, compatible with administration to humans or other vertebrate hosts. Typically, a pharmaceutically acceptable diluent, excipient, and/or carrier is a diluent, excipient, and/or carrier approved by a regulatory agency of a Federal, a state government, or other regulatory agency, or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in animals, including humans as well as non-human mammals. The term diluent, excipient, and/or "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the pharmaceutical composition is administered. Such pharmaceutical diluent, excipient, and/or carriers can be sterile liquids, such as water and oils, including those of petroleum, animal, vegetable or synthetic origin. Water, saline solutions and aqueous dextrose and glycerol solutions can be employed as liquid

diluents, excipients, and/or carriers, particularly for injectable solutions. Suitable pharmaceutical diluents and/or excipients include starch, glucose, lactose, sucrose, gelatin, malt, rice, flour, chalk, silica gel, sodium stearate, glycerol monostearate, talc, sodium chloride, dried skim milk, glycerol, propylene, glycol, water, ethanol and the like. The composition, if desired, can also contain minor amounts of wetting, bulking, emulsifying agents, or pH buffering agents. These compositions can take the form of solutions, suspensions, emulsion, sustained release formulations and the like. Examples of suitable pharmaceutical diluent, excipient, and/or carriers are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin. The formulation should suit the mode of administration. The appropriate diluent, excipient, and/or carrier will be evident to those skilled in the art and will depend in large part upon the route of administration.

A "protective" immune response refers to the ability of an immunogenic composition to elicit an immune response, either humoral or cell mediated, which serves to protect the subject from an infection. The protection provided need not be absolute, i.e., the infection need not be totally prevented or eradicated, if there is a statistically significant improvement compared with a control population of subjects, *e.g.* infected animals not administered the vaccine or immunogenic composition. Protection may be limited to mitigating the severity or rapidity of onset of symptoms of the infection. In general, a "protective immune response" would include the induction of an increase in antibody levels specific for a particular antigen in at least 50% of subjects, including some level of measurable functional antibody responses to each antigen. In particular situations, a "protective immune response" could include the induction of a two fold increase in antibody levels or a four fold increase in antibody levels specific for a particular antigen in at least 50% of subjects, including some level of measurable functional antibody responses to each antigen. In certain embodiments, opsonising antibodies correlate with a protective immune response. Thus, protective immune response may be assayed by measuring the percent decrease in the bacterial count in a serum bactericidal activity (SBA) assay or an opsonophagocytosis assay, for instance those described below. Such assays are also known in the art. For meningococcal vaccines, for example, the SBA assay is an established surrogate for protection. In some embodiments, there is a decrease in bacterial count of at least 10%, 25%, 50%,

65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% or more, as compared to the bacterial count in the absence of the immunogenic composition.

The terms "protein", "polypeptide" and "peptide" refer to a polymer of amino acid residues and are not limited to a minimum length of the product. Thus, peptides, oligopeptides, dimers, multimers, and the like, are included within the definition. Both full-length proteins and fragments thereof are encompassed by the definition. The terms also include modifications, such as deletions, additions and substitutions (generally conservative in nature, but which may be non-conservative), to a native sequence, preferably such that the protein maintains the ability to elicit an immunological response within an animal to which the protein is administered. Also included are post-expression modifications, *e.g.* glycosylation, acetylation, lipidation, phosphorylation and the like.

Active variants and fragments of the disclosed polynucleotides and polypeptides are also described herein. "Variants" refer to substantially similar sequences. As used herein, a "variant polypeptide" refers to a polypeptide derived from the native protein by a modification of one or more amino acids at the N-terminal and/or C-terminal end of the native protein. The modification may include deletion (so-called truncation) of one or more amino acids at the N-terminal and/or C-terminal end of the native protein; deletion and/or addition of one or more amino acids at one or more internal sites in the native protein; or substitution of one or more amino acids at one or more sites in the native protein. Variant polypeptides continue to possess the desired biological activity of the native polypeptide, that is, they are immunogenic. A variant of an polypeptide or polynucleotide sequence disclosed herein (i.e. SEQ ID NOS: 1-25 or 39) will typically have at least about 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more sequence identity with the reference sequence.

The term "fragment" refers to a portion of an amino acid or nucleotide sequence comprising a specified number of contiguous amino acid or nucleotide residues. In particular embodiments, a fragment of a polypeptide disclosed herein may retain the biological activity of the full-length polypeptide and hence be immunogenic. Fragments of a polynucleotide may encode protein fragments that retain the biological activity of the protein and hence be immunogenic. Alternatively, fragments of a polynucleotide that are useful as PCR primers generally do not retain biological activity. Thus, fragments of a nucleotide sequence disclosed herein may range from at least about 15, 20, 30, 40,

50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, or 1500 contiguous nucleotides or up to the full-length polynucleotide. Fragments of a polypeptide sequence disclosed herein may comprise at least 10, 15, 20, 25, 30, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 400, 425, 450, 475, or 500 contiguous amino acids, or up to the total number of amino acids present in the full-length polypeptide.

The term "recombinant" as used herein refers to any protein, polypeptide, or cell expressing a gene of interest that is produced by genetic engineering methods. The term "recombinant" as used with respect to a protein or polypeptide, means a polypeptide produced by expression of a recombinant polynucleotide. The proteins of the present invention may be isolated from a natural source or produced by genetic engineering methods. "Recombinant," as used herein, further describes a nucleic acid molecule, which, by virtue of its origin or manipulation, is not associated with all or a portion of the polynucleotide with which it is associated in nature. The term "recombinant" as used with respect to a host cell means a host cell which includes a recombinant polynucleotide.

The term "subject" refers to a mammal, bird, fish, reptile, or any other animal. The term "subject" also includes humans. The term "subject" also includes household pets. Non-limiting examples of household pets include: dogs, cats, pigs, rabbits, rats, mice, gerbils, hamsters, guinea pigs, ferrets, birds, snakes, lizards, fish, turtles, and frogs. The term "subject" also includes livestock animals. Non-limiting examples of livestock animals include: alpaca, bison, camel, cattle, deer, pigs, horses, llamas, mules, donkeys, sheep, goats, rabbits, reindeer, yak, chickens, geese, and turkeys.

The term “mammals” as used herein refers to any mammal, such as, for example, humans, mice, rabbits, non-human primates. In a preferred embodiment, the mammal is a human.

The terms "vaccine" or "vaccine composition", which are used interchangeably, refer to pharmaceutical compositions comprising at least one immunogenic composition that induces an immune response in a subject.

General Description

The present invention also identifies previously unidentified difficulties expressing non-lipidated P2086 variants and provides methods for overcoming these difficulties and novel compositions therefrom. While plasmid constructs encoding non-lipidated P2086 variants provided strong expression of the non-lipidated variants, these variants were pyruvylated on the N-terminal Cys. Pyruvylation prevents or reduces the likelihood of manufacturing consistency or uniformity of the polypeptides. The inventors further found that deletion of the N-terminal Cys from the non-lipidated P2086 variant sequences avoided pyruvylation of non-lipidated P2086 variants. Attempts to overcome the pyruvylation by deletion of the codon for the N-terminal Cys either abrogated expression or resulted in the expression of insoluble variants. Alternatively, removal of the N-terminal Cys from the non-lipidated P2086 variants decreased expression in some variants. Surprisingly, however, the inventors discovered that at least non-pyruvylated non-lipidated A05, A12, A22, A62, B01, B09, B22, and B44 variants can be expressed despite deletion of the N-terminal Cys residue. Generally, these polypeptides could be expressed without additional modifications other than the Cys deletion, as compared to the corresponding wild-type non-lipidated sequence. See, for example, Examples 2 and 4. Furthermore, the inventors discovered that the non-pyruvylated non-lipidated variants were surprisingly immunogenic and they unexpectedly elicited bactericidal antibodies.

Accordingly, the present invention provides two methods for overcoming or reducing the likelihood of these difficulties in expressing non-lipidated variants. However, additional methods are contemplated by the present invention. The first method was to vary the length of the Gly/Ser stalk in the N-terminal tail, immediately downstream of the N-terminal Cys. The second method was codon optimization within the N-terminal tail. However, optimization of additional codons is contemplated by the present invention. These methods provide enhanced expression of soluble non-lipidated P2086 variants. For example, in one embodiment, enhanced expression of soluble non-lipidated P2086 variants is compared to expression of the corresponding wild-type non-lipidated variants.

Isolated polypeptides

The inventors surprisingly discovered isolated non-pyruvylated, non-lipidated ORF2086 polypeptides. The inventors further discovered that the polypeptides are unexpectedly immunogenic and are capable of eliciting a bactericidal immune response.

As used herein, the term "non-pyruvylated" refers to a polypeptide having no pyruvate content. Non-lipidated ORF2086 polypeptides having a pyruvate content typically exhibited a mass shift of +70, as compared to the corresponding wild-type polypeptide. In one embodiment, the inventive polypeptide does not exhibit a mass shift of +70 as compared to the corresponding wild-type non-lipidated polypeptide when measured by mass spectrometry. See, for example, Example 10.

In another embodiment, the isolated non-pyruvylated, non-lipidated ORF2086 polypeptide includes a deletion of an N-terminal cysteine residue compared to the corresponding wild-type non-lipidated ORF2086 polypeptide. The term "N-terminal cysteine" refers to a cysteine (Cys) at the N-terminal or N-terminal tail of a polypeptide. More specifically, the "N-terminal cysteine" as used herein refers to the N-terminal cysteine at which LP2086 lipoproteins are lipidated with a tripalmitoyl lipid tail, as is known in the art. For example, when referring to any one of SEQ ID NOs: 12-21 as a reference sequence, the N-terminal cysteine is located at position 1. As another example, when referring to SEQ ID NO: 70 as a reference sequence, the N-terminal cysteine is located at position 1.

The term "wild-type non-lipidated ORF2086 polypeptide" or "wild-type non-lipidated 2086 polypeptide" or "wild-type non-lipidated polypeptide" as used herein refers to an ORF2086 polypeptide having an amino acid sequence that is identical to the amino acid sequence of the corresponding mature lipidated ORF2086 polypeptide found in nature. The only difference between the non-lipidated and lipidated molecules is that the wild-type non-lipidated ORF2086 polypeptide is not lipidated with a tripalmitoyl lipid tail at the N-terminal cysteine.

As is known in the art, the non-lipidated 2086 form is produced by a protein lacking the original leader sequence or 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. See, for example, WO2003/063766, which is incorporated herein by reference in its entirety.

Examples of a non-lipidated ORF2086 include not only a wild-type non-lipidated ORF2086 polypeptide just described but also polypeptides having an amino acid sequence according to any one of SEQ ID NOs: 12-21 wherein the N-terminal Cys is deleted and polypeptides having an amino acid sequence according to any one of SEQ ID NOs: 12-21 wherein the N-terminal Cys is substituted with an amino acid that is not a Cys residue. Another example of a non-lipidated ORF2086 polypeptide includes a polypeptide having an amino acid sequence according to SEQ ID NO: 70 wherein the N-terminal Cys is deleted and a polypeptide having an amino acid sequence according to SEQ ID NO: 70 wherein the N-terminal Cys is substituted with an amino acid that is not a Cys residue. Further examples of a non-lipidated ORF2086 polypeptide include amino acid sequences selected from SEQ ID NO: 44 (B44), SEQ ID NO: 49 (B09), SEQ ID NO: 55 (A05), SEQ ID NO: 57 (B01), SEQ ID NO: 58 (B01), SEQ ID NO: 62 (B22), SEQ ID NO: 64 (A22), and SEQ ID NO: 75 (B22). Yet further examples of a non-lipidated ORF2086 polypeptide include amino acid sequences selected from SEQ ID NO: 66 (A12), SEQ ID NO: 68 (A22), and SEQ ID NO: 71 (A62). More examples include SEQ ID NO: 80 (B24) and SEQ ID NO: 81 (B24). Additional examples of a non-lipidated ORF2086 polypeptide include the amino acid sequences set forth in SEQ ID NO: 76 and SEQ ID NO: 77. In one embodiment, the non-lipidated polypeptide includes the amino acid sequence that is at least about 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or 100% identical to a sequence encoding the corresponding non-lipidated polypeptide. For example, in an exemplary embodiment, the non-lipidated A62 polypeptide includes the amino acid sequence that is at least about 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or 100% identical to SEQ ID NO: 71.

Examples of a wild-type non-lipidated ORF2086 polypeptide include polypeptides having an amino acid sequence according to any one of SEQ ID NOs: 12-21, shown in Figure 2, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 , and SEQ ID NO: 60. Another example of a wild-type non-lipidated ORF2086 polypeptide includes a polypeptide having the amino acid sequence according to SEQ ID NO: 70. These exemplary wild-type non-lipidated ORF2086 polypeptides include an N-terminal Cys.

As used herein, for example, a “non-lipidated” B44 polypeptide includes a polypeptide having the amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 21, SEQ ID

NO: 21 wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted, and SEQ ID NO: 44. A "wild-type non-lipidated" B44 polypeptide includes a polypeptide having the amino acid sequence SEQ ID NO: 21. A "non-pyruvylated non-lipidated" B44 polypeptide includes a polypeptide having the amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 21 wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted, and SEQ ID NO: 44.

As another example, as used herein, a "non-lipidated" B09 polypeptide includes a polypeptide having the amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 18 wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted, SEQ ID NO: 49, and SEQ ID NO: 50. A "wild-type non-lipidated" B09 polypeptide includes a polypeptide having the amino acid sequence SEQ ID NO: 18. A "non-pyruvylated non-lipidated" B09 includes a polypeptide having the amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 18 wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted, SEQ ID NO: 49, and SEQ ID NO: 50.

As yet a further example, as used herein, a "non-lipidated" A05 polypeptide includes a polypeptide having the amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 13 wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted, and SEQ ID NO: 55. Another example of a "non-lipidated" A05 polypeptide includes a polypeptide having the amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 13 wherein the N-terminal Cys at position 1 is substituted with an amino acid that is not a Cys residue. An additional example of a "non-lipidated" A05 polypeptide includes a polypeptide having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 76. Yet another example of a "non-lipidated" A05 polypeptide includes a polypeptide having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 77. A "wild-type non-lipidated" A05 includes a polypeptide having the amino acid sequence SEQ ID NO: 13. A "non-pyruvylated non-lipidated" A05 includes a polypeptide having the amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 13 wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted and SEQ ID NO: 55. Further examples of a "non-pyruvylated non-lipidated" A05 includes a polypeptide having the amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 13 wherein the N-terminal Cys at position 1 is substituted with an amino acid that is not a Cys residue; SEQ ID NO: 76 wherein the Cys at position 1 is deleted; SEQ ID NO: 76 wherein the Cys at position 1 is substituted with an amino acid that is not a Cys residue; and SEQ ID NO: 77.

As used herein, a "non-lipidated" A62 polypeptide includes a polypeptide having the amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 70 wherein the N-

terminal Cys at position 1 is deleted, and SEQ ID NO: 71. Another example of a non-lipidated A62 polypeptide includes a polypeptide having SEQ ID NO: 70 wherein the N-terminal Cys at position 1 is substituted with an amino acid that is not a Cys residue. A "wild-type non-lipidated" A62 polypeptide includes a polypeptide having the amino acid sequence SEQ ID NO: 70. A "non-pyruvylated non-lipidated" A62 includes a polypeptide having the amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 70 wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted, and SEQ ID NO: 71. Another example of a non-pyruvylated non-lipidated A62 polypeptide includes a polypeptide having SEQ ID NO: 70 wherein the N-terminal Cys at position 1 is substituted with an amino acid that is not a Cys residue. Preferably, a "non-pyruvylated non-lipidated" A62 includes a polypeptide having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 71.

As used herein, a "non-lipidated" A12 polypeptide includes a polypeptide having the amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 14 wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted, and SEQ ID NO: 66. A "wild-type non-lipidated" A12 polypeptide includes a polypeptide having the amino acid sequence SEQ ID NO: 14. A "non-pyruvylated non-lipidated" A12 includes a polypeptide having the amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 14 wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted, and SEQ ID NO: 66.

As used herein, a "non-lipidated" A22 polypeptide includes a polypeptide having the amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 15 wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted, SEQ ID NO: 64, and SEQ ID NO: 68. A "wild-type non-lipidated" A22 polypeptide includes a polypeptide having the amino acid sequence SEQ ID NO: 15. A "non-pyruvylated non-lipidated" A22 includes a polypeptide having the amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 15 wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted, SEQ ID NO: 64, and SEQ ID NO: 68. Preferably, a "non-pyruvylated non-lipidated" A22 includes a polypeptide having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 68.

The term "deletion" of the N-terminal Cys as used herein includes a mutation that deletes the N-terminal Cys, as compared to a wild-type non-lipidated polypeptide sequence. For example, a "deletion" of the N-terminal Cys refers to a removal of the amino acid Cys from a reference sequence, e.g., from the corresponding wild-type sequence, thereby resulting in a decrease of an amino acid residue as compared to the

reference sequence. Unless otherwise described, the terms "N-terminal Cys," "N-terminal Cys at position 1," "Cys at position 1" are interchangeable.

In another embodiment, the N-terminal Cys is substituted with an amino acid that is not a Cys residue. For example, in an exemplary embodiment, the N-terminal Cys at position 1 of SEQ ID NOs: 12-21 includes a C→G substitution at position 1. See, for example, SEQ ID NO: 62 as compared to SEQ ID NO: 19 (B22 wild-type), and SEQ ID NO: 64 as compared to SEQ ID NO: 15 (A22 wild-type). Exemplary amino acids to replace the N-terminal Cys include any non-Cys amino acid, preferably a polar uncharged amino acid such as, for example, glycine. In a preferred embodiment, the substitution is made with a non-conservative residue to Cys.

The inventors surprisingly discovered that expressing non-lipidated ORF2086 polypeptides having a deletion of an N-terminal Cys residue resulted in no detectable pyruvylation when measured by mass spectrometry, as compared to the corresponding wild-type non-lipidated ORF2086 polypeptide. Examples of non-pyruvylated non-lipidated ORF2086 polypeptides include those having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:12 (A04), SEQ ID NO:13 (A05), SEQ ID NO:14 (A12), SEQ ID NO:15 (A22), SEQ ID NO:16 (B02), SEQ ID NO:17 (B03), SEQ ID NO:18 (B09), SEQ ID NO:19 (B22), SEQ ID NO: 20 (B24), SEQ ID NO: 21 (B44), and SEQ ID NO: 70 (A62), wherein the cysteine at position 1 is deleted. Another example of a non-pyruvylated non-lipidated ORF2086 polypeptide includes a polypeptide having the amino acid sequence SEQ ID NO: 58 (B01), wherein the cysteine at position 1 is deleted. Additional examples of isolated non-pyruvylated, non-lipidated ORF2086 polypeptides include polypeptides having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 44 , SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 , SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 71, and SEQ ID NO: 75. A further example of a non-pyruvylated non-lipidated ORF2086 polypeptide includes a polypeptide having the amino acid sequence SEQ ID NO: 57 (B01). Another example of an isolated non-pyruvylated non-lipidated ORF2086 polypeptide includes a polypeptide having SEQ ID NO: 77 (A05); a polypeptide having SEQ ID NO: 76 (A05) wherein the Cys at position 1 is deleted; and a polypeptide having SEQ ID NO: 76 (A05) wherein the Cys at position 1 is substituted with an amino acid that is not a Cys residue. Further examples of non-pyruvylated non-lipidated ORF2086 polypeptides include those having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:12

(A04), SEQ ID NO:13 (A05), SEQ ID NO:14 (A12), SEQ ID NO:15 (A22), SEQ ID NO: 58 (B01), SEQ ID NO:16 (B02), SEQ ID NO:17 (B03), SEQ ID NO:18 (B09), SEQ ID NO:19 (B22), SEQ ID NO: 20 (B24), SEQ ID NO: 21 (B44), and SEQ ID NO: 70 (A62) wherein the cysteine at position 1 is substituted with an amino acid that is not a Cys residue. Preferably, the non-pyruvylated non-lipidated 2086 polypeptide includes at least about 250, 255, or 260 consecutive amino acids, and at most about 270, 269, 268, 267, 266, 265, 264, 263, 260, 259, 258, 257, 256, or 255 consecutive amino acids. Any minimum value may be combined with any maximum value to define a range. More preferably, the polypeptide has at least 254 or 262 consecutive amino acids. In some embodiments, the polypeptide has at most 262 consecutive amino acids. In other embodiments, the polypeptide has at most 254 consecutive amino acids. In one embodiment, the non-pyruvylated non-lipidated polypeptide includes the amino acid sequence that is at least about 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or 100% identical to a sequence encoding the corresponding non-pyruvylated non-lipidated polypeptide. For example, in an exemplary embodiment, the non-pyruvylated non-lipidated A62 polypeptide includes the amino acid sequence that is at least about 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or 100% identical to SEQ ID NO: 71.

In one embodiment, the isolated non-pyruvylated, non-lipidated ORF2086 polypeptide is encoded by a nucleotide sequence that is operatively linked to an expression system, wherein the expression system is capable of being expressed in a bacterial cell. In an exemplary embodiment, the nucleotide sequence is linked to a regulatory sequence that controls expression of the nucleotide sequence.

Suitable expression systems, regulatory sequences, and bacterial cells are known in the art. For example, any plasmid expression vector, e.g., PET™ (Novogen, Madison Wis.) or PMAL™ (New England Biolabs, Beverly, Mass.) can be used as long as the polypeptide is able to be expressed in a bacterial cell. Preferably, the PET™ vector is used for cloning and expression of recombinant proteins in *E. coli*. In the PET™ system, the cloned gene may be expressed under the control of a phage T7 promotor. Exemplary bacterial cells include *Pseudomonas fluorescens*, and preferably, *E. coli*.

In one aspect, the invention relates to a non-pyruvylated non-lipidated ORF2086 polypeptide obtainable by the process. The polypeptide is preferably isolated. The invention further relates to compositions that include a non-pyruvylated non-lipidated ORF2086 polypeptide obtainable by a process. The composition is preferably an immunogenic composition. The process includes expressing a nucleotide sequence encoding a polypeptide having the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 58, and SEQ ID NO: 70, wherein the cysteine at position 1 is deleted. In another embodiment, the process includes expressing a nucleotide sequence encoding a polypeptide having the amino acid sequence SEQ ID NO: 76, wherein the cysteine at position 1 is deleted. In a further embodiment, the process includes expressing a nucleotide sequence encoding a polypeptide having the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 58, and SEQ ID NO: 70, wherein the cysteine at position 1 is substituted with an amino acid that is not a Cys residue. The nucleotide sequence is operatively linked to an expression system that is capable of being expressed in a bacterial cell.

In one embodiment, the process includes expressing a nucleotide sequence encoding a polypeptide having the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 49 , SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 57, and SEQ ID NO: 75. In another embodiment, the process includes expressing a nucleotide sequence encoding a polypeptide having the amino acid sequence SEQ ID NO: 77. In another embodiment, the nucleotide sequence is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, and SEQ ID NO: 72. Preferably the bacterial cell is *E. coli*.

B09, B44, A05: In one aspect, the invention relates to a composition that includes a first isolated polypeptide, which includes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 49 (B09), and a second isolated polypeptide, which includes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 44 (B44). In a preferred embodiment, the

polypeptides are immunogenic. In another preferred embodiment, the composition further includes an ORF2086 subfamily A polypeptide from serogroup B *N. meningitidis*. Preferably, the ORF2086 subfamily A polypeptide is a non-pyruvylated non-lipidated ORF2086 subfamily A polypeptide. In an exemplary embodiment, the ORF2086 subfamily A polypeptide is A05, examples of which include, for example, SEQ ID NO: 13, wherein the N-terminal cysteine at position 1 is deleted, and SEQ ID NO: 55. In another exemplary embodiment, the composition includes a non-pyruvylated non-lipidated A05 polypeptide having the amino acid sequence SEQ ID NO: 76 wherein the Cys at position 1 is deleted; SEQ ID NO: 76 wherein the Cys at position 1 is substituted with an amino acid that is not a Cys residue; and SEQ ID NO: 77.

Polypeptide domains

In another aspect, the invention relates to a method for producing an isolated polypeptide. The method includes expressing in a bacterial cell a polypeptide, which includes a sequence having greater than 90% identity to SEQ ID NO:21, said sequence includes at least one domain selected from the group consisting of amino acids 13-18 of SEQ ID NO: 21, amino acids 21-34 of SEQ ID NO: 21, and amino acids 70-80 of SEQ ID NO: 21, or a combination thereof, wherein the polypeptide lacks an N-terminal cysteine. The method further includes purifying the polypeptide. The polypeptide produced therein includes a non-pyruvylated non-lipidated ORF2086 polypeptide. Preferably, the polypeptide is immunogenic. In a preferred embodiment, the bacterial cell is *E. coli.*

Examples of polypeptides that include at least one domain selected from the group consisting of amino acids 13-18 of SEQ ID NO: 21, amino acids 21-34 of SEQ ID NO: 21, and amino acids 70-80 of SEQ ID NO: 21, or a combination thereof, include SEQ ID NO: 12 (A04), SEQ ID NO: 13 (A05), SEQ ID NO: 14 (A12), SEQ ID NO: 15 (A22), SEQ ID NO: 16 (B02), SEQ ID NO: 17 (B03), SEQ ID NO: 18 (B09), SEQ ID NO: 19 (B22), SEQ ID NO: 20 (B24), and SEQ ID NO: 21 (B44). Preferably the cysteine at position 1 of these polypeptides is deleted. In another embodiment, the cysteine at position 1 is substituted with an amino acid that is not a Cys residue. Further exemplary polypeptides include SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 62, and SEQ ID NO: 64. Another exemplary polypeptide includes SEQ ID NO: 70 and SEQ ID NO: 71. A further exemplary polypeptide includes SEQ ID NO: 76.

Yet another exemplary polypeptide includes SEQ ID NO: 77. Additional examples include SEQ ID NO: 80 (B24) and SEQ ID NO: 81 (B24).

In one exemplary embodiment, the isolated polypeptide sequence further includes at least one domain selected from the group consisting of amino acids 96-116 of SEQ ID NO: 21, amino acids 158-170 of SEQ ID NO: 21, amino acids 172-185 of SEQ ID NO: 21, amino acids 187-199 of SEQ ID NO: 21, amino acids 213-224 of SEQ ID NO: 21, amino acids 226-237 of SEQ ID NO: 21, amino acids 239-248 of SEQ ID NO: 21, or a combination thereof. Examples of polypeptides that include at least one domain selected from the group consisting of amino acids 13-18 of SEQ ID NO: 21, amino acids 21-34 of SEQ ID NO: 21, and amino acids 70-80 of SEQ ID NO: 21, or a combination thereof, and further including at least one domain selected from the group consisting of amino acids 96-116 of SEQ ID NO: 21, amino acids 158-170 of SEQ ID NO: 21, amino acids 172-185 of SEQ ID NO: 21, amino acids 187-199 of SEQ ID NO: 21, amino acids 213-224 of SEQ ID NO: 21, amino acids 226-237 of SEQ ID NO: 21, amino acids 239-248 of SEQ ID NO: 21, or a combination thereof, include SEQ ID NO: 16 (B02), SEQ ID NO: 17 (B03), SEQ ID NO: 18 (B09), SEQ ID NO: 19 (B22), SEQ ID NO: 20 (B24), and SEQ ID NO: 21 (B44). Preferably the cysteine at position 1 of these polypeptides is deleted. Further exemplary polypeptides include a polypeptide having the amino acid sequence selected from SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, and SEQ ID NO: 55, and SEQ ID NO: 62.

In one aspect, the invention relates to an isolated polypeptide produced by a process described herein. In one embodiment, the isolated polypeptide is a non-pyruvylated non-lipidated polypeptide. In another aspect, the invention relates to an immunogenic composition produced by a process described herein.

Nucleotide sequences encoding the polypeptides

B09: In one aspect, the invention relates to an isolated polypeptide that includes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 18 wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted or SEQ ID NO: 49. Exemplary nucleotide sequences that encode SEQ ID NO: 49 include sequences selected from SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, and SEQ ID NO: 48. Preferably, the nucleotide sequence is SEQ ID NO: 46. In one aspect, the invention relates to an isolated nucleotide sequence that includes SEQ ID NO: 46. In one aspect, the invention relates to an isolated nucleotide sequence that includes

SEQ ID NO: 47. In one aspect, the invention relates to an isolated nucleotide sequence that includes SEQ ID NO: 48.

In one aspect, the invention relates to a plasmid including a nucleotide sequence selected from SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, and SEQ ID NO: 45, wherein the plasmid is capable of being expressed in a bacterial cell. Suitable expression systems, regulatory sequences, and bacterial cells are known in the art, as described above. Preferably, the bacterial cell is *E. coli*.

In another aspect, the invention relates to an isolated polypeptide that includes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 50. In an exemplary embodiment, SEQ ID NO: 50 is encoded by SEQ ID NO: 45.

B44: In yet another aspect, the invention relates to an isolated polypeptide that includes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 21 wherein the N-terminal Cys is deleted or SEQ ID NO: 44. Exemplary nucleotide sequences that encode SEQ ID NO: 44 include sequences selected from SEQ ID NO: 43 and SEQ ID NO: 51. Preferably, the nucleotide sequence is SEQ ID NO: 43. In one aspect, the invention relates to an isolated nucleotide sequence that includes SEQ ID NO: 43.

A05: In one aspect, the invention relates to an isolated polypeptide that includes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 13 (A05) wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted or SEQ ID NO: 55. Exemplary nucleotide sequences that encode SEQ ID NO: 55 include sequences selected from SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 65, and SEQ ID NO: 73. Preferably, the nucleotide sequence is SEQ ID NO: 65. In one aspect, the invention relates to an isolated nucleotide sequence that includes SEQ ID NO: 54. In one aspect, the invention relates to an isolated nucleotide sequence that includes SEQ ID NO: 65. In one aspect, the invention relates to an isolated nucleotide sequence that includes SEQ ID NO: 73.

A12: In another aspect, the invention relates to an isolated polypeptide that includes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 14 (A12) wherein the N-terminal Cys is deleted or SEQ ID NO: 66. Exemplary nucleotide sequences that encode SEQ ID NO: 66 include SEQ ID NO: 67. In one aspect, the invention relates to an isolated nucleotide sequence that includes SEQ ID NO: 67.

A22: In yet another aspect, the invention relates to an isolated polypeptide that includes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 15 (A22) wherein the N-terminal Cys is deleted or SEQ ID NO: 68. Exemplary nucleotide sequences that

encode SEQ ID NO: 68 include SEQ ID NO: 69. In one aspect, the invention relates to an isolated nucleotide sequence that includes SEQ ID NO: 69.

A62: In one aspect, the invention relates to an isolated polypeptide having an amino acid sequence that is at least 95% identical to SEQ ID NO: 71, wherein the first 20 amino acid residues of the sequence does not contain a cysteine. Preferably, the polypeptide includes the amino acid sequence as shown at positions 1-184 of SEQ ID NO: 71. The polypeptide is preferably non-lipidated and non-pyruvylated. In another embodiment, the polypeptide is immunogenic.

In another embodiment, the isolated polypeptide includes a fragment of A62. Exemplary fragments of A62 includes any number of contiguous residues from SEQ ID NO: 70 or SEQ ID NO: 71. In one embodiment, the isolated polypeptide includes the amino acid sequence at positions 158-185 of SEQ ID NO: 71. In another embodiment, the isolated polypeptide includes the amino acid sequence at positions 159-186 of SEQ ID NO: 71. In one embodiment, the polypeptide includes at least 6 contiguous amino acids from the amino acid sequence at positions 185-254 of SEQ ID NO: 71.

In another aspect, the invention relates to an isolated nucleic acid sequence encoding an isolated polypeptide having an amino acid sequence that is at least 95% identical to SEQ ID NO: 71, wherein the first 20 amino acid residues of the sequence does not contain a cysteine. Preferably, the polypeptide consists of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 71. In one embodiment, the isolated nucleic acid sequence includes SEQ ID NO: 72.

In yet another aspect, the invention relates to an isolated polypeptide that includes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 70 (A62) wherein the N-terminal Cys is deleted or SEQ ID NO: 71. Exemplary nucleotide sequences that encode SEQ ID NO: 71 include SEQ ID NO: 72. In one aspect, the invention relates to an isolated nucleotide sequence that includes SEQ ID NO: 72.

Immunogenic Compositions

In a preferred embodiment, the compositions described herein including an isolated non-pyruvylated non-lipidated ORF2086 polypeptide are immunogenic. Immunogenic compositions that include a protein encoded by a nucleotide sequence from *Neisseria meningitidis* ORF2086 are known in the art. Exemplary immunogenic compositions include those described in WO2003/063766, and US patent application publication numbers US 20060257413 and US 20090202593, which are incorporated herein by reference in their entirety. Such immunogenic compositions described therein include a protein exhibiting bactericidal activity identified as ORF2086 protein, immunogenic portions thereof, and/or biological equivalents thereof. The ORF2086 protein refers to a protein encoded by open reading frame 2086 of *Neisseria* species.

The protein may be a recombinant protein or an isolated protein from native *Neisseria* species. For example, *Neisseria* ORF2086 proteins 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 ORF2086 proteins include 2086 Subfamily A proteins and Subfamily B proteins, immunogenic portions thereof, and/or biological equivalents thereof. 2086 subfamily A proteins and 2086 subfamily B proteins are known in the art, see, for example Fletcher et al., 2004 cited above and Murphy et al., *J Infect Dis.* 2009 Aug 1;200(3):379-89. See also WO2003/063766, which discloses SEQ ID NOs: 260 to 278 therein as representing amino acid sequences associated with proteins of 2086 Subfamily A. In addition, disclosed in WO2003/063766 are SEQ ID NOS: 279 to 299 therein as representing amino acid sequences associated with proteins of 2086 Subfamily B. WO2003/063766 is incorporated herein by reference in its entirety. The ORF2086 proteins or equivalents thereof, etc. may be lipidated or non lipidated. Preferably, the Neisseria ORF2086 protein is non lipidated. Alternatively, the immunogenic compositions may be combinations of lipidated and non lipidated ORF2086 proteins.

In (an) one embodiment, the immunogenic composition includes an isolated protein having at least 95% amino acid sequence identity to a protein encoded by a nucleotide sequence from *Neisseria* ORF2086. In another embodiment, the

immunogenic composition includes an isolated protein having at least about 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or 100% identical amino acid sequence identity to a protein encoded by a nucleotide sequence from *Neisseria* ORF2086.

In one embodiment, the immunogenic composition includes an isolated protein having at least 95% amino acid sequence identity to a Subfamily A protein encoded by a nucleotide sequence from *Neisseria* ORF2086. Preferably, the immunogenic composition includes an isolated Subfamily A protein encoded by a nucleotide sequence from *Neisseria* ORF2086. In some embodiments, the ORF2086 Subfamily A polypeptide is an A05, an A04, an A12, an A62, or an A22 variant. In some embodiments, the ORF2086 Subfamily A polypeptide is an A05, an A12, or an A22 variant.

Combination of subfamily A polypeptides: In one embodiment, the composition includes any combination of ORF2086 Subfamily A polypeptides. Exemplary combinations of ORF2086 Subfamily A polypeptides include, for example, A05 and A12; A05 and A22; A05 and A62; A12 and A62; A12 and A22; A22 and A62; A05, A12, and A22; A05, A12, and A62; A12, A22, and A62; and A05, A22, and A62. Preferably, the ORF2086 Subfamily A polypeptide is non-lipidated and non-pyruvylated.

In another embodiment, the immunogenic composition includes an isolated protein having at least 95% amino acid sequence identity to a Subfamily B protein encoded by a nucleotide sequence from *Neisseria* ORF2086. Preferably, the immunogenic composition includes an isolated Subfamily B protein encoded by a nucleotide sequence from *Neisseria* ORF2086. In some embodiments, the ORF2086 Subfamily B protein is a B44, a B02, a B03, a B22, a B24 or a B09 variant. In some embodiments, the ORF2086 Subfamily B protein is a B44, a B22, or a B09 variant.

Combination of subfamily B polypeptides: In one embodiment, the composition includes any combination of ORF2086 Subfamily B polypeptides. Exemplary combinations of ORF2086 Subfamily B polypeptides include, for example, B09 and B22; B22 and B44; B44 and B09; B01 and B09; B01 and B22; B01 and B44; and B09, B22, and B44; B09 and B24; B22 and B24; B24 and B44; B01 and B24; B02 and B24; B02 and B01; B02 abd B09; B02 and B44; B01, B09, and B24; B01, B24, and B44.

In a preferred embodiment, the immunogenic composition includes an isolated non-pyruvylated non-lipidated polypeptide having at least 95% amino acid sequence identity to a Subfamily B protein encoded by a nucleotide sequence from *Neisseria* ORF2086. For example, in some embodiments, the ORF2086 Subfamily B protein is sequences selected from a B44 having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 21; a B02 having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 16; a B03 having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 17; a B22 having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19; a B24 having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 20; a B01 having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:58; or a B09 variant having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:18, wherein the N-terminal Cys is deleted, or a combination thereof.

More preferably, the immunogenic composition includes a non-pyruvylated non-lipidated B09 polypeptide, a non-pyruvylated non-lipidated B44 polypeptide, or combinations thereof. In one embodiment, the composition includes a non-pyruvylated non-lipidated B09 variant having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:18, wherein the N-terminal Cys is deleted, a non-pyruvylated non-lipidated B44 having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 21, wherein the N-terminal Cys is deleted, or a combination thereof. In another embodiment, the immunogenic composition includes a non-pyruvylated non-lipidated B09 having SEQ ID NO: 49, a non-pyruvylated non-lipidated B44 having SEQ ID NO: 44, or a combination thereof.

In one aspect, the invention relates to an immunogenic composition that includes an ORF2086 subfamily B polypeptide from serogroup B *N. meningitidis*, wherein the polypeptide is a non-pyruvylated non-lipidated B44. The B44 may include the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 21, wherein the N-terminal Cys is deleted or SEQ ID NO: 44. In one embodiment, the composition further includes a second ORF2086 subfamily B polypeptide from serogroup B *N. meningitidis*, wherein the second polypeptide is a non-pyruvylated non-lipidated B09. The B09 may include the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 18, wherein the N-terminal Cys is deleted, or SEQ ID NO: 49. In one embodiment, the immunogenic composition is a vaccine.

In another embodiment, the composition includes no more than 3 ORF2086 subfamily B polypeptides. In a further embodiment, the composition includes no more than 2 ORF2086 subfamily B polypeptides.

In a further embodiment, the composition includes at most 1, 2, or 3 species of an ORF2086 subfamily B variant. In a further embodiment, the composition includes at most 1, 2, or 3 species of an ORF2086 subfamily A variant.

Compositions including a Subfamily B polypeptide and a Subfamily A polypeptide: In one embodiment, the composition further includes one or more ORF2086 subfamily A polypeptides. In a preferred embodiment, the composition includes an A05 subfamily A polypeptide. More preferably, the A05 subfamily A polypeptide is non-lipidated and non-pyruvylated. In another preferred embodiment, the composition includes an A62 subfamily A polypeptide. More preferably, the A62 subfamily A polypeptide is non-lipidated and non-pyruvylated.

In yet another embodiment, the immunogenic composition includes an isolated protein having at least 95% amino acid sequence identity to a Subfamily A protein encoded by a nucleotide sequence from *Neisseria* ORF2086, and an isolated protein having at least 95% amino acid sequence identity to a Subfamily B protein encoded by a nucleotide sequence from *Neisseria* ORF2086.

Preferably, the immunogenic composition includes an isolated Subfamily A protein encoded by a nucleotide sequence from *Neisseria* ORF2086 and an isolated Subfamily B protein encoded by a nucleotide sequence from *Neisseria* ORF2086. More preferably, the immunogenic composition includes an isolated non-pyruvylated non-lipidated Subfamily A ORF2086 polypeptide and an isolated non-pyruvylated non-lipidated Subfamily B ORF2086 polypeptide.

Combinations: Any combination of ORF2086 polypeptides are contemplated. In one embodiment, the composition includes at least one Subfamily A polypeptide in the absence of Subfamily B polypeptides. For example, the composition includes only Subfamily A polypeptides. In another embodiment, the composition includes at least one Subfamily B polypeptide in the absence of Subfamily A polypeptides. For example, the composition includes only Subfamily A polypeptides.

The immunogenic composition may include any Subfamily A polypeptide or combination thereof. In some embodiments, the ORF2086 Subfamily A polypeptide is an A05, an A04, an A12, or an A22 variant. In another embodiment, the ORF2086 Subfamily A polypeptide includes A62. In a preferred embodiment, the ORF2086 Subfamily A polypeptide is an A05 having an amino acid sequence as shown in SEQ ID

NO: 13; an A04 having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 12; an A12 having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 14; or an A22 variant having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 15, wherein the N-terminal Cys is deleted, or any combination thereof. Yet another exemplary immunogenic composition includes a combination of isolated non-pyruvylated non-lipidated A05 and A62 Subfamily A ORF2086 polypeptides. For example, the immunogenic composition may include a polypeptide having SEQ ID NO: 55 and a polypeptide having SEQ ID NO: 71. A further exemplary immunogenic composition includes a combination of isolated non-pyruvylated non-lipidated A05 and A12 Subfamily A ORF2086 polypeptides. Another exemplary immunogenic composition includes a combination of isolated non-pyruvylated non-lipidated A12 and A62 Subfamily A ORF2086 polypeptides.

The immunogenic composition may include any Subfamily B polypeptide or combination thereof. In some embodiments, the ORF2086 Subfamily B protein is a B44, a B02, a B03, a B22, a B24 or a B09 variant. In a preferred embodiment, the ORF2086 Subfamily B protein is a B44 having the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 21; a B02 having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 16; a B03 having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 17; a B22 having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19; a B24 having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 20; or a B09 variant having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:18, wherein the N-terminal Cys is deleted, or a combination thereof. Yet another exemplary immunogenic composition includes a combination of isolated non-pyruvylated non-lipidated B09 and B44 Subfamily B ORF2086 polypeptides. A further exemplary immunogenic composition includes a combination of isolated non-pyruvylated non-lipidated B09 and B22 Subfamily B ORF2086 polypeptides. Another exemplary immunogenic composition includes a combination of isolated non-pyruvylated non-lipidated B22 and B44 Subfamily B ORF2086 polypeptides. An additional exemplary immunogenic composition includes a combination of isolated non-pyruvylated non-lipidated B09, B22, and B44 Subfamily B ORF2086 polypeptides.

In one embodiment, the composition includes a non-lipidated ORF2086 polypeptide in the absence of a lipidated ORF2086 polypeptide. In another embodiment, the composition includes a non-lipidated ORF2086 polypeptide and at least one lipidated ORF2086 polypeptide.

In one embodiment, the composition includes a non-pyruvylated non-lipidated ORF2086 polypeptide in the absence of a lipidated ORF2086 polypeptide. In another embodiment, the composition includes a lipidated ORF2086 polypeptide and a non-pyruvylated non-lipidated ORF2086 polypeptide. For example, the composition may include a lipidated A05 polypeptide having SEQ ID NO: 76 and a non-pyruvylated non-lipidated A05 having SEQ ID NO: 77. Another exemplary composition includes a lipidated A05 polypeptide having SEQ ID NO: 76 and a non-pyruvylated non-lipidated A62 having SEQ ID NO: 71. An additional exemplary composition includes a lipidated B01 polypeptide having SEQ ID NO: 58 and a non-pyruvylated non-lipidated A62 having SEQ ID NO: 71.

Exemplary combinations: One exemplary immunogenic composition includes a combination of an isolated non-lipidated A05, B09, B22, and B44 ORF2086 polypeptides. For example, the immunogenic composition may include a non-pyruvylated non-lipidated A05 (SEQ ID NO: 55) Subfamily A ORF2086 polypeptide and isolated non-pyruvylated non-lipidated B09 (SEQ ID NO: 49), B22 (SEQ ID NO: 75), and B44 (SEQ ID NO: 44) Subfamily B ORF2086 polypeptides.

Another exemplary immunogenic composition includes a combination of isolated non-pyruvylated non-lipidated A05 and A12 Subfamily A ORF2086 polypeptides and isolated non-pyruvylated non-lipidated B22 and B44 Subfamily B ORF2086 polypeptides. A further exemplary immunogenic composition includes isolated non-pyruvylated non-lipidated A05, A12, B09, and B44 polypeptides. Yet another example includes isolated non-pyruvylated non-lipidated A12, A62, B09, and B44 polypeptides. Yet a further example includes isolated non-pyruvylated non-lipidated A05, A12, A62, B09, and B44 polypeptides. Another exemplary immunogenic composition includes isolated non-pyruvylated non-lipidated A62 and B09 polypeptides. Another exemplary immunogenic composition includes isolated non-pyruvylated non-lipidated A62 and B44 polypeptides. Another exemplary immunogenic composition includes isolated non-pyruvylated non-lipidated A62, B09, and B44 polypeptides. Another exemplary immunogenic composition includes isolated non-pyruvylated non-lipidated A05, A62, and B44 polypeptides. Another exemplary immunogenic composition includes isolated non-pyruvylated non-lipidated A05, A62, B09, and B44 polypeptides.

In one embodiment, the immunogenic composition includes a 1:1 ratio of a Subfamily A protein to a Subfamily B protein. In another embodiment, the immunogenic

composition includes any one of the following ratios of a Subfamily A polypeptide to a Subfamily B polypeptide: 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5; 1:6; 1:7; 1:8; 1:9; or 1:10. In another embodiment, the immunogenic composition includes any one of the following ratios of a Subfamily B polypeptide to a Subfamily A polypeptide: 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5; 1:6; 1:7; 1:8; 1:9; or 1:10.

Bactericidal immune responses

In one aspect, the isolated polypeptides and compositions described herein elicit a bactericidal immune response in a mammal against infection from any serogroup of *N. meningitidis*, such as a serogroup selected from serogroup A, B, C, E29, H, I, K, L, W-135, X , Y and Z. In a preferred embodiment, the isolated polypeptides and compositions described herein elicit a bactericidal immune response in a mammal against infection from serogroups A, B, C, W-135, Y and/or X.

In another aspect, the isolated polypeptides and compositions described herein elicit a bactericidal immune response in a mammal against an ORF2086 polypeptide from serogroup B *N. meningitidis*. The compositions have the ability to induce bactericidal anti-meningococcal antibodies after administration to a mammal, and in preferred embodiments can induce antibodies that are bactericidal against strains with the respective subfamilies. Further information on bactericidal responses is given below. See, for example, Examples 6, 11, 12, and 13.

In one embodiment, the compositions elicit a bactericidal immune response against a heterologous subfamily of *N. meningitidis* serogroup B. For example, a composition including a non-lipidated subfamily A polypeptide may elicit a bactericidal immune response against a subfamily A variant of *N. meningitidis* serogroup B and/or against a subfamily B variant of *N. meningitidis* serogroup B. See, for example, Examples 18-19.

In a further aspect, the isolated polypeptides and compositions described herein elicit a bactericidal immune response against at least one of serogroup A, serogroup B, serogroup C, serogroup W135, and/or serogroup Y strains of *N. meningitidis.* In a preferred embodiment, the compositions elicit a bactericidal immune response at least against serogroup B, serogroup C, and serogroup Y of *N. meningitidis*. See, for example, Example 21.

Bactericidal antibodies are an indicator of protection in humans and preclinical studies serve as a surrogate, and any new immunogenic composition candidate described herein should elicit these functional antibodies.

B09: In one aspect, the isolated non-lipidated B09 polypeptide, and immunogenic compositions thereof, elicits bactericidal antibodies against (e.g., that can bind to) an ORF2086 polypeptide from serogroup B *N. meningitidis*, subfamily B. In an exemplary embodiment, the isolated non-pyruvylated non-lipidated B09 polypeptide having SEQ ID NO: 18 wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted or SEQ ID NO: 49, and immunogenic compositions thereof, elicits bactericidal antibodies against (e.g., that can bind to) an ORF2086 polypeptide from serogroup B *N. meningitidis*, subfamily A or preferably subfamily B. Preferably, the non-pyruvylated non-lipidated B09 polypeptide and immunogenic compositions thereof, elicits bactericidal antibodies against the A05 variant (SEQ ID NO: 13); B44 variant (SEQ ID NO: 21); B16 variant (SEQ ID NO: 60); B24 variant (SEQ ID NO: 20); B09 variant (SEQ ID NO: 18), or a combination thereof. In an exemplary embodiment, the non-pyruvylated non-lipidated B09 polypeptide and immunogenic compositions thereof, elicits bactericidal antibodies against B44 variant (SEQ ID NO: 21); B16 variant (SEQ ID NO: 60); B24 variant (SEQ ID NO: 20); B09 variant (SEQ ID NO: 18), or a combination thereof. See, for example, Example 11, Example 12, and Example 13.

B44: In one aspect, the isolated non-lipidated B44 polypeptide, and immunogenic compositions thereof, elicits bactericidal antibodies against (e.g., that can bind to) an ORF2086 polypeptide from serogroup B *N. meningitidis*, subfamily B. In another exemplary embodiment, the isolated non-pyruvulated non-lipidated B44 polypeptide having SEQ ID NO: 21 wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted or SEQ ID NO: 44, and immunogenic compositions thereof, elicits bactericidal antibodies against (e.g., that can bind to) an ORF2086 polypeptide from serogroup B *N. meningitidis*, subfamily B. Preferably, the non-pyruvylated non-lipidated B44 polypeptide and immunogenic compositions thereof, elicits bactericidal antibodies against the B44 variant (SEQ ID NO: 21); B16 variant (SEQ ID NO: 60); B24 variant (SEQ ID NO: 20); B09 variant (SEQ ID NO: 18), or a combination thereof. See, for example, Example 11. Additionally, the non-pyruvylated non-lipidated B44 polypeptide and immunogenic compositions thereof may also elicit bactericidal antibodies that bind to the B02 variant (SEQ ID NO: 16). See, for example, Example 12 and Example 13.

Moreover, the non-pyruvylated non-lipidated B44 polypeptide and immunogenic compositions thereof may also elicit bactericidal antibodies that bind to B03 variant (SEQ ID NO: 17) and B15 variant (SEQ ID NO: 59). See, for example, Example 6.

B22: In one aspect, the isolated non-lipidated B22 polypeptide, and immunogenic compositions thereof, elicits bactericidal antibodies against (e.g., that can bind to) an ORF2086 polypeptide from serogroup B *N. meningitidis*, subfamily B. In a further exemplary embodiment, the isolated non-pyruvulated non-lipidated B22 polypeptide having SEQ ID NO: 19 wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted, and immunogenic compositions thereof, elicits bactericidal antibodies against (e.g., that can bind to) an ORF2086 polypeptide from serogroup B *N. meningitidis*, subfamily B. Preferably, the non-pyruvylated non-lipidated B22 polypeptide elicits bactericidal antibodies against the B44 variant (SEQ ID NO: 21); B16 variant (SEQ ID NO: 60); B24 variant (SEQ ID NO: 20); B09 variant (SEQ ID NO: 18), or a combination thereof. See, for example, Example 13.

A05: In one aspect, the isolated non-lipidated A05 polypeptide, and immunogenic compositions thereof, elicits bactericidal antibodies against (e.g., that can bind to) an ORF2086 polypeptide from serogroup B *N. meningitidis*, subfamily A. In one embodiment, the isolated non-pyruvylated non-lipidated A05 polypeptide having SEQ ID NO: 13 wherein the N-terminal Cys is deleted or SEQ ID NO: 55, and immunogenic compositions thereof, elicits bactericidal antibodies against (e.g., that can bind to) an ORF2086 polypeptide from serogroup B *N. meningitidis*, subfamily A. In one embodiment, the isolated A05 polypeptide includes the amino acid sequence SEQ ID NO: 76, wherein the cysteine at position 1 is deleted. In another embodiment, the isolated A05 polypeptide includes the amino acid sequence SEQ ID NO: 76, wherein the cysteine at position 1 is substituted with an amino acid that is not a Cys residue. In one embodiment, the isolated A05 polypeptide includes the amino acid sequence SEQ ID NO: 77. Preferably, the non-pyruvylated non-lipidated A05 and immunogenic compositions thereof, elicits bactericidal antibodies against the A05 variant (SEQ ID NO: 13), A22 variant (SEQ ID NO: 15), A12 variant (SEQ ID NO: 14), or a combination thereof. See, for example, Example 6 and 13.

A62: In one aspect, the isolated non-lipidated A62 polypeptide, and immunogenic compositions thereof, elicits bactericidal antibodies against (e.g., that can bind to) an ORF2086 polypeptide from serogroup B *N. meningitidis*, subfamily A. In one

embodiment, the isolated A62 polypeptide includes the amino acid sequence SEQ ID NO: 70, wherein the cysteine at position 1 is substituted with an amino acid that is not a Cys residue. In another embodiment, the isolated non-pyruvylated non-lipidated A62 polypeptide having SEQ ID NO: 70 wherein the N-terminal Cys is deleted or SEQ ID NO: 71, and immunogenic compositions thereof, elicits bactericidal antibodies against (e.g., that can bind to) an ORF2086 polypeptide from serogroup B *N. meningitidis*, subfamily A and/or subfamily B. For example, the non-pyruvylated non-lipidated A62 and immunogenic compositions thereof, elicits bactericidal antibodies against the A05 variant (SEQ ID NO: 13), A12 variant (SEQ ID NO: 14), A22 variant (SEQ ID NO: 15), and A62 variant (SEQ ID NO: 70). As another example, the non-pyruvylated non-lipidated A62 and immunogenic compositions thereof, elicits bactericidal antibodies against the A29 variant, B09 variant, and B24 variant. See, for example, Examples 18-19. In another embodiment, the non-pyruvylated non-lipidated A62 and immunogenic compositions thereof, elicits bactericidal antibodies against the B16 variant.

A12: In one embodiment, the isolated non-pyruvylated non-lipidated A12 polypeptide having SEQ ID NO: 14 wherein the N-terminal Cys is deleted or SEQ ID NO: 66, and immunogenic compositions thereof, elicits bactericidal antibodies against an ORF2086 polypeptide from serogroup B *N. meningitidis*, subfamily A and/or subfamily B. Preferably, the non-pyruvylated non-lipidated A12 and immunogenic compositions thereof, elicits bactericidal antibodies against the A05 variant (SEQ ID NO: 13), A22 variant (SEQ ID NO: 15), A12 variant (SEQ ID NO: 14), A62 variant (SEQ ID NO: 70), A29 variant, B09 variant. See, for example, Examples 18-19.

In one embodiment, the isolated non-pyruvylated non-lipidated A22 polypeptide having SEQ ID NO: 15 wherein the N-terminal Cys is deleted or SEQ ID NO: 68, and immunogenic compositions thereof, elicits bactericidal antibodies against (e.g., that can bind to) an ORF2086 polypeptide from serogroup B *N. meningitidis*, subfamily A and/or subfamily B. Preferably, the non-pyruvylated non-lipidated A22 and immunogenic compositions thereof, elicits bactericidal antibodies against the A05 variant (SEQ ID NO: 13), A22 variant (SEQ ID NO: 15), A62 variant (SEQ ID NO: 70), A29 variant. See, for example, Examples 18-19.

Method of eliciting bactericidal antibodies

In one aspect, the invention relates to a method of eliciting bactericidal antibodies specific to serogroup A *N. meningitidis* in a mammal. In one aspect, the invention relates to a method of eliciting bactericidal antibodies specific to serogroup C *N. meningitidis* in a mammal. In one aspect, the invention relates to a method of eliciting bactericidal antibodies specific to serogroup W135 *N. meningitidis* in a mammal. In one aspect, the invention relates to a method of eliciting bactericidal antibodies specific to serogroup X *N. meningitidis* in a mammal. In one aspect, the invention relates to a method of eliciting bactericidal antibodies specific to serogroup Y *N. meningitidis* in a mammal. In one aspect, the invention relates to a method of eliciting bactericidal antibodies specific to serogroups A, B, C, W-135, X and/or Y *N. meningitidis* in a mammal. In one aspect, the invention relates to a method of eliciting bactericidal antibodies specific to serogroup B *N. meningitidis* in a mammal. In an exemplary embodiment, the method includes eliciting bactericidal antibodies specific to an ORF2086 subfamily B serogroup B *N. meningitidis*, an ORF2086 subfamily A serogroup B *N. meningitidis*, or a combination thereof.

The method includes administering to the mammal an effective amount of an isolated non-pyruvylated non-lipidated 2086 polypeptide or immunogenic composition thereof, as described above. See, for example, Examples 18-19, and 22.

In a preferred embodiment, the method includes eliciting bactericidal antibodies specific to an ORF2086 subfamily B serogroup B *N. meningitidis*. The isolated polypeptide or immunogenic composition includes a non-pyruvylated non-lipidated B44 polypeptide. In another preferred embodiment, the composition further includes a non-pyruvylated non-lipidated B09 polypeptide. In an exemplary embodiment, the isolated polypeptide or immunogenic composition includes SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 44, or a combination thereof. In another exemplary embodiment, the isolated polypeptide or immunogenic composition includes SEQ ID NO: 18, wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted, SEQ ID NO: 21, wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted, or a combination thereof, In yet another exemplary embodiment, the isolated polypeptide or immunogenic composition includes SEQ ID NO: 19, wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted. In one embodiment, the immunogenic composition for eliciting bactericidal antibodies specific to an ORF2086 subfamily B serogroup B *N.*

meningitidis includes at least one of a non- pyruvylated non-lipidated A05, A12, and A62 polypeptide. See, for example, Example 19.

In a preferred embodiment, the method includes eliciting bactericidal antibodies specific to an ORF2086 subfamily A serogroup B *N. meningitidis*. The isolated polypeptide or immunogenic composition includes a non-pyruvylated non-lipidated A05 polypeptide. In a preferred embodiment, the isolated polypeptide or immunogenic composition includes SEQ ID NO: 13, wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted. In another preferred embodiment, the composition further includes a non-pyruvylated non-lipidated B44 polypeptide. See, for example, Example 6 and 13. In an exemplary embodiment, the isolated polypeptide or immunogenic composition includes SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 44, or a combination thereof. In a preferred embodiment, the isolated polypeptide or immunogenic composition includes SEQ ID NO: 13, wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted, SEQ ID NO: 21, wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted, or a combination thereof. In another exemplary embodiment, the isolated polypeptide or immunogenic composition includes SEQ ID NO: 77 (A05), SEQ ID NO: 44 (B44), or a combination thereof. In one embodiment, the immunogenic composition for eliciting bactericidal antibodies specific to an ORF2086 subfamily A serogroup B *N. meningitidis* includes at least one of a non- pyruvylated non-lipidated A05, A12, and A62 polypeptide. See, for example, Examples 18-19.

When an exemplary immunogenic composition including at least two non-pyruvylated non-lipidated ORF2086 polypeptides as described above was administered to mammals, the inventors surprisingly discovered that a synergistic bactericidal immune response may be elicited against serogroup B of *Neisseria meningitidis*, as compared to an immunogenic composition including one respective non-pyruvylated non-lipidated ORF2086 polypeptide. See, for example, Example 19. Accordingly, in one embodiment, the immunogenic composition includes at least a first non-pyruvylated non-lipidated ORF2086 polypeptide that acts synergistically with at least a second pyruvylated non-lipidated ORF2086 polypeptide to elicit an immune response against serogroup B of *Neisseria meningitidis*.

In another aspect, the invention relates to a method of eliciting bactericidal antibodies specific to serogroup C of *N. meningitidis* in a mammal. The method includes administering to the mammal an effective amount of an isolated non-pyruvylated non-lipidated 2086 polypeptide from *N. meningitidis* serogroup B or an

immunogenic composition thereof, as described above. See, for example, Example 22. In one embodiment, the polypeptide includes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 71 or the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, and SEQ ID NO: 21, wherein the cysteine at position 1 is deleted. In one embodiment, the polypeptide includes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 71 or the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, and SEQ ID NO: 21, wherein the cysteine at position 1 is substituted with an amino acid that is not a Cys residue. In another embodiment, the immunogenic composition further includes at least one conjugate selected from: a) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A, b) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C, c) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup W135, and d) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup Y. An exemplary immunogenic composition includes at least an isolated non-pyruvylated non-lipidated A62 polypeptide and a) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A, b) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C, c) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup W135, and d) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup Y.

In a further aspect, the invention relates to a method of eliciting bactericidal antibodies specific to serogroup Y of *N. meningitidis* in a mammal. The method includes administering to the mammal an effective amount of an isolated non-pyruvylated non-lipidated 2086 polypeptide from *N. meningitidis* serogroup B or an immunogenic composition thereof, as described above. See, for example, Example 22. In one embodiment, the polypeptide includes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 71 or the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, and SEQ ID NO: 21, wherein the cysteine at position 1 is deleted. In one embodiment, the polypeptide includes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 71 or the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID

NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, and SEQ ID NO: 21, wherein the cysteine at position 1 is substituted with an amino acid that is not a Cys residue. In another embodiment, the immunogenic composition further includes at least one conjugate selected from: a) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A, b) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C, c) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup W135, and d) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup Y.

In a further aspect, the invention relates to a method of eliciting bactericidal antibodies specific to serogroup X of *N. meningitidis* in a mammal. The method includes administering to the mammal an effective amount of an isolated non-pyruvylated non-lipidated 2086 polypeptide from *N. meningitidis* serogroup B or an immunogenic composition thereof, as described above. See, for example, Example 22. In one embodiment, the polypeptide includes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 71 or the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, and SEQ ID NO: 21, wherein the cysteine at position 1 is deleted. In one embodiment, the polypeptide includes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 71 or the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, and SEQ ID NO: 21, wherein the cysteine at position 1 is substituted with an amino acid that is not a Cys residue. In another embodiment, the immunogenic composition further includes at least one conjugate selected from: a) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A, b) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C, c) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup W135, and d) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup Y.

When an exemplary immunogenic composition including four non-pyruvylated non-lipidated ORF2086 polypeptides and a conjugate of a capsular saccharide of each of *Neisseria meningitidis* serogroups A, C, W135, and Y as described above was administered to mammals, the inventors surprisingly discovered that a synergistic bactericidal immune response may be elicited at least against serogroups B, C, and Y

of *Neisseria meningitidis*, as compared to an immunogenic composition including the ORF2086 polypeptides wherein conjugates of a capsular saccharide are absent, and as compared to an immunogenic composition including a conjugate of a capsular saccharide of each of *Neisseria meningitidis* serogroups A, C, W135, and Y wherein an ORF2086 polypeptide is absent. See, for example, Example 22. Accordingly, in one embodiment, the immunogenic composition includes at least one non-pyruvylated non-lipidated ORF2086 polypeptide that acts synergistically with at least one conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A, C, W135, and Y to elicit an immune response against *Neisseria meningitidis*. The immune response elicited may be against at least one of serogroups B, C, and Y of *Neisseria meningitidis*.The immunogenic composition may include a protein encoded by a nucleotide sequence from *Neisseria* ORF2086, polynucleotides, or equivalents thereof as the sole active immunogen in the immunogenic composition. Alternatively, the immunogenic composition may further include 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.

Any multi-antigen or multi-valent immunogenic composition is contemplated by the present invention. For example, the immunogenic composition may include combinations of two or more ORF2086 proteins, a combination of ORF2086 protein with one or more Por A proteins, a combination of ORF2086 protein with *meningococcus* serogroup A, C, Y and W135 polysaccharides and/or polysaccharide conjugates, a combination of ORF2086 protein with *meningococcus* and *pneumococcus* combinations, or a combination of any of the foregoing in a form suitable for a desired administration, e.g., for mucosal delivery. Persons of skill in the art would be readily able to formulate such multi-antigen or multi-valent immunologic compositions.

In one aspect, the invention relates to an immunogenic composition including an isolated non-lipidated, non-pyruvylated ORF2086 polypeptide from *Neisseria meningitidis* serogroup B, and at least one conjugate selected from: a) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A, b) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C, c) a conjugate of a capsular

saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup W135, and d) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup Y.

In one embodiment, the immunogenic composition includes an isolated non-lipidated, non-pyruvylated ORF2086 polypeptide from *Neisseria meningitidis* serogroup B, and at least two of the conjugates. In another embodiment, the composition includes at least three of the conjugates. For example, the compositions may include saccharides from: serogroups A and C; serogroups A and W135; serogroups A and Y; serogroups C and W135; serogroups W135 and Y; serogroups A, C, and W135; serogroups A, C, and Y; serogroups A, W135, and Y; serogroups C and W135, and Y. Compositions including at least one serogroup C saccharide are preferred (e.g., C and Y).

In yet another embodiment, the immunogenic composition includes an isolated non-lipidated, non-pyruvylated ORF2086 polypeptide from *Neisseria meningitidis* serogroup B, and four conjugates, e.g., a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A; a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C; a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup W135; and a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup Y.

In a preferred embodiment, the conjugate is a conjugate of the capsular saccharide and a carrier protein. Suitable carrier proteins are known in the art. Preferably, the carrier protein is a bacterial toxin, such as a diphtheria or tetanus toxin, or toxoids or mutants thereof. Most preferably, the carrier protein is CRM_{197}. For example, in one embodiment, the composition includes at least one conjugate selected from (a) a conjugate of (i) the capsular saccharide of serogroup A *N. meningitidis* and (ii) CRM_{197}; (b) a conjugate of (i) the capsular saccharide of serogroup C *N. meningitidis* and (ii) CRM_{197}; (c) a conjugate of (i) the capsular saccharide of serogroup W135 *N. meningitidis* and (ii) CRM_{197}; and (d) a conjugate of (i) the capsular saccharide of serogroup Y *N. meningitidis* and (ii) CRM_{197}.

The capsular saccharides of serogroups A, C, W135, and Y are characterized and known in the art. For example, the capsular saccharide of serogroup A meningococcus is a homopolymer of (α 1→6)-linked N-acetyl-D-mannosamine-1-phosphate, with partial O-acetylation in the C3 and C4 positions. Acetylation at the C-3 position can be 70-95%. Conditions used to purify the saccharide can result in de-O-

acetylation (e.g. under basic conditions), but it is useful to retain OAc at this C-3 position. In some embodiments, at least 50% (e.g. at least 60%, 70%, 80%, 90%, 95% or more) of the mannosamine residues in a serogroup A saccharides are O-acetylated at the C-3 position. Acetyl groups can be replaced with blocking groups to prevent hydrolysis, and such modified saccharides are still serogroup A saccharides within the meaning of the invention.

The serogroup C capsular saccharide is a homopolymer of (α 2→9)-linked sialic acid (N-acetyl neuraminic acid). Most serogroup C strains have O-acetyl groups at C-7 and/or C-8 of the sialic acid residues, but some clinical isolates lack these O-acetyl groups.

The serogroup W135 saccharide is a polymer of sialic acid-galactose disaccharide units. Like the serogroup C saccharide, it has variable O-acetylation, but at sialic acid 7 and 9 positions. The structure is written as: →4)-D-Neu*p*NAc(7/9OAc)-*α*-(2→6)-D-Gal-*α*-(1→.

The serogroup Y saccharide is similar to the serogroup W135 saccharide, except that the disaccharide-repeating unit includes glucose instead of galactose. The serogroup Y structure is written as: →4)-D-Neu*p*NAc(7/9OAc)-*α*-(2→6)-D-Glc-*α*-(1→. Like serogroup W135, it has variable O-acetylation at sialic acid 7 and 9 positions.

The saccharides used according to the invention may be O-acetylated as described above, e.g., with the same O-acetylation pattern as seen in native capsular saccharides, or they may be partially or totally de-O-acetylated at one or more positions of the saccharide rings, or they may be hyper-O- acetylated relative to the native capsular saccharides.

In one embodiment, immunogenic composition includes an isolated non-lipidated, non-pyruvylated ORF2086 polypeptide from *Neisseria meningitidis* serogroup B, and at least one conjugate selected from: a) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A, b) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C, c) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup W135, and d) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup Y, wherein the non-lipidated, non-pyruvylated ORF2086 polypeptide includes at least one of the following: B44, B09, A05, B22, A12, A22, A62, B24, B16, B15, and B03. In one embodiment, the polypeptide includes the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 44, SEQ ID

NO: 49, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 71, and SEQ ID NO: 75. In another embodiment, the polypeptide includes the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, and SEQ ID NO: 20, wherein the cysteine at position 1 is deleted. In another embodiment, the polypeptide includes the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, and SEQ ID NO: 20, wherein the cysteine at position 1 is substituted with an amino acid that is not a Cys residue.

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 human papillomavirus virus (HPV), such as the HPV vaccine GARDASIL®, 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.

The ORF2086 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, or serotypes of *N. meningitidis*, specifically meningococcus serogroups specifically serogroup B, and/or against several diseases. Alternatively, one of the ORF2086 polypeptides can be used as a carrier protein for other immunogenic polypeptides. Formulation of such immunogenic compositions is well known to persons skilled in this field.

Immunogenic compositions of the invention preferably include a pharmaceutically acceptable excipient, diluents, and/or carrier. Suitable pharmaceutically acceptable excipients, 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 excipients, diluents, and/or 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 excipients, diluents, and/or carriers may further include 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 excipients, diluents, and/or 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.

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. Biotechniques;11(4):474-85, (1991). and by Sedegah et al. PNAS Vol. 91, pp. 9866-9870, (1994). 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. Preferably, the immunogenic composition is administered intramuscularly.

The immunogenic compositions of the present invention can further comprise one or more additional "immunomodulators", which are agents that perturb or alter the immune system, such that either up-regulation or down-regulation of humoral and/or cell-mediated immunity is observed. In one particular embodiment, up-regulation of the humoral and/or cell-mediated arms of the immune system is preferred. Examples of certain immunomodulators include, for example, an adjuvant or cytokine, or ISCOMATRIX (CSL Limited, Parkville, Australia), described in U.S. Patent No. 5,254,339 among others.

Non-limiting examples of adjuvants that can be used in the vaccine of the present invention include the RIBI adjuvant system (Ribi Inc., Hamilton, Mont.), alum, mineral gels such as aluminum hydroxide gel, oil-in-water emulsions, water-in-oil emulsions such as, *e.g.*, Freund's complete and incomplete adjuvants, Block copolymer (CytRx, Atlanta Ga.), QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.), SAF-M (Chiron, Emeryville Calif.), AMPHIGEN® adjuvant, saponin, Quil A or other saponin fraction, monophosphoryl lipid A, and Avridine lipid-amine adjuvant. Non-limiting examples of oil-in-water emulsions useful in the vaccine of the invention include modified SEAM62

and SEAM 1/2 formulations. Modified SEAM62 is an oil-in-water emulsion containing 5% (v/v) squalene (Sigma), 1% (v/v) SPAN® 85 detergent (ICI Surfactants), 0.7% (v/v) polysorbate ® 80 detergent (ICI Surfactants), 2.5% (v/v) ethanol, 200 µg/ml Quil A, 100 µg/ml cholesterol, and 0.5% (v/v) lecithin. Modified SEAM 1/2 is an oil-in-water emulsion comprising 5% (v/v) squalene, 1% (v/v) SPAN® 85 detergent, 0.7% (v/v) polysorbate 80 detergent, 2.5% (v/v) ethanol, 100 µg/ml Quil A, and 50 µg/ml cholesterol.

Other "immunomodulators" that can be included in the vaccine include, *e.g.*, one or more interleukins, interferons, or other known cytokines or chemokines. In one embodiment, the adjuvant may be a cyclodextrin derivative or a polyanionic polymer, such as those described in U.S. patent numbers 6,165,995 and 6,610,310, respectively. It is to be understood that the immunomodulator and/or adjuvant to be used will depend on the subject to which the vaccine or immunogenic composition will be administered, the route of injection and the number of injections to be given.

In some embodiments, the adjuvant is saponin. In some embodiments, the saponin concentration is between 1 µg/ml and 250 µg/ml; between 5 µg/ml and 150 µg/ml; or between 10 µg/ml and 100 µg/ml. In some embodiments, the saponin concentration is about 1 µg/ml; about 5 µg/ml; about 10 µg/ml; about 20 µg/ml; about 30 µg/ml; about 40 µg/ml; about 50 µg/ml; about 60 µg/ml; about 70 µg/ml; about 80 µg/ml; about 90 µg/ml; about 100 µg/ml; about 110 µg/ml; about 120 µg/ml; about 130 µg/ml; about 140 µg/ml; about 150 µg/ml; about 160 µg/ml; about 170 µg/ml; about 180 µg/ml; about 190 µg/ml; about 200 µg/ml; about 210 µg/ml; about 220 µg/ml; about 230 µg/ml; about 240 µg/ml; or about 250 µg/ml.

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.

An amount (i.e., dose) of immunogenic composition that is administered to the patient can be determined in accordance with standard techniques known to those of ordinary skill in the art, taking into consideration such factors as the particular antigen, the adjuvant (if present), the age, sex, weight, species, condition of the particular patient, and the route of administration.

For example, a dosage for an adolescent human patient may include at least 0.1µg, 1 µg, 10 µg, or 50 µg of a *Neisseria* ORF2086 protein, and at most 80 µg, 100 µg, 150 µg, or 200 µg of a *Neisseria* ORF2086 protein. Any minimum value and any maximum value may be combined to define a suitable range.

Adjuvants

Immunogenic compositions as described herein also comprise, in certain embodiments, one or more adjuvants. An adjuvant is a substance that enhances the immune response when administered together with an immunogen or antigen. A number of cytokines or lymphokines have been shown to have immune modulating activity, and thus are useful as adjuvants, including, but not limited to, the interleukins 1-α, 1-β, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,723,127), 13, 14, 15, 16, 17 and 18 (and its mutant forms); the interferons-α, β and γ; granulocyte-macrophage

colony stimulating factor (GM-CSF) (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,078,996 and ATCC Accession Number 39900); macrophage colony stimulating factor (M-CSF); granulocyte colony stimulating factor (G-CSF); and the tumor necrosis factors α and β.

Still other adjuvants that are useful with the immunogenic compositions described herein include chemokines, including without limitation, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, and RANTES; adhesion molecules, such as a selectin, *e.g.*, L-selectin, P-selectin and E-selectin; mucin-like molecules, *e.g.*, CD34, GlyCAM-1 and MadCAM-1; a member of the integrin family such as LFA-1, VLA-1, Mac-1 and p150.95; a member of the immunoglobulin superfamily such as PECAM, ICAMs, *e.g.*, ICAM-1, ICAM-2 and ICAM-3, CD2 and LFA-3; co-stimulatory molecules such as B7-1, B7-2,CD40 and CD40L; growth factors including vascular growth factor, nerve growth factor, fibroblast growth factor, epidermal growth factor, PDGF, BL-1, and vascular endothelial growth factor; receptor molecules including Fas, TNF receptor, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, and DR6; and Caspase (ICE).

Other exemplary adjuvants include, but are not limited to aluminum hydroxide; aluminum phosphate; STIMULON™ QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Framingham, Mass.); MPL™ (3-O-deacylated monophosphoryl lipid A; Corixa, Hamilton, Mont.), 529 (an amino alkyl glucosamine phosphate compound, Corixa, Hamilton, Mont.), IL-12 (Genetics Institute, Cambridge, Mass.); GM-CSF (Immunex Corp., Seattle, Wash.); 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-ethylamin e) (CGP 19835A, referred to as MTP-PE); and cholera toxin. In certain preferred embodiments, the adjuvant is QS-21.

Additional exemplary adjuvants include 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.

Aluminum phosphate has been used as the adjuvant in a phase 1 clinical trial to a concentration 0.125 mg/dose, much lower than the limit of 0.85 mg/ dose specified by the US Code of Federal Regulations [610.15(a)]. Aluminum-containing adjuvants are widely used in humans to potentiate the immune response of antigens when administered intramuscularly or subcutaneously. In some embodiments, the concentration of aluminum in the immunogenic composition is between 0.125 μg/ml and 0.5 μg/ml; between 0.20 μg/ml and 0.40 μg/ml; or between 0.20 μg/ml and 0.30 μg/ml. In some embodiments, the concentration of aluminum in the immunogenic composition is about 0.125 μg/ml; about 0.15 μg/ml; about 0.175 μg/ml; about 0.20 μg/ml; about 0.225 μg/ml; about 0.25 μg/ml; about 0.275 μg/ml; about 0.30 μg/ml; about 0.325 μg/ml; about 0.35 μg/ml; about 0.375 μg/ml; about 0.40 μg/ml; about 0.425 μg/ml; about 0.45 μg/ml; about 0.475 μg/ml; or about 0.50 μg/ml.

In a preferred embodiment, the concentration of aluminum in the immunogenic composition is between 0.125 mg/ml and 0.5 mg/ml; between 0.20 mg/ml and 0.40 mg/ml; or between 0.20 mg/ml and 0.30 mg/ml. In some embodiments, the concentration of aluminum in the immunogenic composition is about 0.125 mg/ml; about 0.15 mg/ml; about 0.175 mg/ml; about 0.20 mg/ml; about 0.225 mg/ml; about 0.25 mg/ml; about 0.275 mg/ml; about 0.30 mg/ml; about 0.325 mg/ml; about 0.35 mg/ml; about 0.375 mg/ml; about 0.40 mg/ml; about 0.425 mg/ml; about 0.45 mg/ml; about 0.475 mg/ml; or about 0.50 mg/ml.

Suitable adjuvants used to enhance an immune response further include, without limitation, MPL™ (3-O-deacylated monophosphoryl lipid A, Corixa, Hamilton, MT), which is described in U.S. Patent No. 4,912,094. Also suitable for use as adjuvants are synthetic lipid A analogs or aminoalkyl glucosamine phosphate compounds (AGP), or derivatives or analogs thereof, which are available from Corixa (Hamilton, MT), and which are described in United States Patent No. 6,113,918. One such AGP is 2-[(R)-3-Tetradecanoyloxytetradecanoylamino] ethyl 2-Deoxy-4-O-phosphono-3-O-[(R)-3-tetradecanoyoxytetrade-canoyl]-2-[(R)-3-tetradecanoyloxytetradecanoyl-amino]-b-D-glucopyranoside, which is also known as 529 (formerly known as RC529). This 529 adjuvant is formulated as an aqueous form (AF) or as a stable emulsion (SE).

Still other adjuvants include muramyl peptides, such as N-acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamine (thr-MDP),

N-acetyl-normuramyl-L-alanine-2-(1'-2' dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-hydroxyphosphoryl-oxy)-ethylamine (MTP-PE); oil-in-water emulsions, such as MF59 (U.S. Patent No. 6,299,884) (containing 5% Squalene, 0.5% polysorbate 80, and 0.5% SPAN 85 (optionally containing various amounts of MTP-PE) formulated into submicron particles using a microfluidizer such as Model 110Y microfluidizer (Microfluidics, Newton, MA)), and SAF (containing 10% Squalene, 0.4% polysorbate 80, 5% PLURONIC-blocked polymer L121, and thr-MDP, either microfluidized into a submicron emulsion or vortexed to generate a larger particle size emulsion); incomplete Freund's adjuvant (IFA); aluminum salts (alum), such as aluminum hydroxide, aluminum phosphate, aluminum sulfate; AMPHIGEN; Avridine; L121/squalene; D-lactide-polylactide/glycoside; PLURONIC polyols; killed *Bordetella*; saponins, such as Stimulon™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA.), described in U.S. Patent No. 5,057,540, ISCOMATRIX (CSL Limited, Parkville, Australia), described in U.S. Patent No. 5,254,339, and immunostimulating complexes (ISCOMATRIX); *Mycobacterium tuberculosis*; bacterial lipopolysaccharides; synthetic polynucleotides such as oligonucleotides containing a CpG motif (*e.g.*, U.S. Patent No. 6,207,646); IC-31 (Intercell AG, Vienna, Austria), described in European Patent Nos. 1,296,713 and 1,326,634; a pertussis toxin (PT) or mutant thereof, a cholera toxin or mutant thereof (*e.g.*, U.S. Patent Nos. 7,285,281, 7,332,174, 7,361,355 and 7,384,640); or an *E. coli* heat-labile toxin (LT) or mutant thereof, particularly LT-K63, LT-R72 (*e.g.*, U.S. Patent Nos. 6,149,919, 7,115,730 and 7,291,588).

Methods of Producing Non-Lipidated P2086 Antigens

In one aspect, the invention relates to a method of producing a non-pyruvylated non-lipidated ORF2086 polypeptide. The method includes expressing a nucleotide sequence encoding an ORF2086 polypeptide wherein the N-terminal cysteine is deleted as compared to the corresponding wild-type sequence, and wherein the nucleotide sequence is operatively linked to an expression system that is capable of being expressed in a bacterial cell. Exemplary polypeptides produced by the method include any polypeptide described herein. For example, preferably, the polypeptide has the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 70, wherein the cysteine at position 1 is deleted, as compared to the corresponding wild-type sequence. In another

preferred embodiment, the polypeptide has the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 76, wherein the cysteine at position 1 is deleted. Additional exemplary polypeptides include a polypeptide having the amino acid sequences selected from SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 71, and SEQ ID NO: 75. An additional exemplary polypeptide includes a polypeptide having the amino acid sequence SEQ ID NO: 77. Further examples include SEQ ID NO: 80 (B24) and SEQ ID NO: 81 (B24). The method further includes purifying the polypeptide.

In some embodiments, the invention provides a method for producing soluble non-lipidated P2086 antigens comprising the steps of cloning the ORF2086 variant nucleic acid sequence into an *E. coli* expression vector without a lipidation control sequence, transforming *E. coli* bacteria with the ORF2086 expression vector, inducing expression and isolating the expressed P2086 protein. In some embodiments, expression is induced with IPTG.

In some embodiments, the codon for the N-terminal Cys of the ORF2086 variant is deleted. Examples of such codons include TGC. In some embodiments, the codon for the N-terminal Cys of the ORF2086 variant is mutated by point mutagenesis to generate an Ala, Gly, or Val codon. In some embodiments, Ser and Gly codons are added to the N-terminal tail of the ORF2086 variant to extend the Gly/Ser stalk immediately downstream of the N-terminal Cys. In some embodiments, the total number of Gly and Ser residues within the Gly/Ser stalk is at least 7, 8, 9, 10, 11, or 12. In some embodiments, the codon for the N-terminal Cys is deleted. In some embodiments, the N-terminal 7, 8, 9, 10, 11, or 12 residues are either Gly or Ser.

In some embodiments, the codons of the N-terminal tail of the non-lipidated ORF2086 variant are optimized by point mutagenesis. In some embodiments, the N-terminal tail of the non-lipidated ORF2086 variant is optimized to match the N-terminal tail of the B09 variant. In some embodiments, the codons of the N-terminal tail of the ORF2086 variant are optimized by point mutagenesis such that the codon encoding the fifth amino acid of the ORF2086 variant is 100% identical to nucleotides 13-15 of SEQ ID NO: 8 and the codon encoding the thirteenth amino acid of the ORF2086 variant is 100% identical to nucleotides 37-39 of SEQ ID NO: 8. In some embodiments, the N-terminal tail of the non-lipidated ORF2086 variant is optimized such that the 5' 45 nucleic acids are 100% identical to nucleic acids 1-45 of SEQ ID NO:

8. In some embodiments, the N-terminal tail of the non-lipidated ORF2086 variant is optimized such that the 5' 42 nucleic acids are 100% identical to nucleic acids 4-45 of SEQ ID NO: 8. In some embodiments, the N-terminal tail of the non-lipidated ORF2086 variant is optimized such that the 5' 39 nucleic acids are 100% identical to nucleic acids 4-42 of SEQ ID NO: 8. In some embodiments, the N-terminal tail of the non-lipidated P2086 variant comprises at least one amino acid substitution compared to amino acids 1-15 of SEQ ID NO: 18. In some embodiments, the N-terminal tail of the non-lipidated P2086 variant comprises two amino acid substitutions compared to amino acids 1-15 of SEQ ID NO: 18. In some embodiments, the N-terminal tail of the non-lipidated P2086 variant comprises at least one amino acid substitution compared to amino acids 2-15 of SEQ ID NO: 18. In some embodiments, the N-terminal tail of the non-lipidated P2086 variant comprises two amino acid substitutions compared to amino acids 2-15 of SEQ ID NO: 18. In some embodiments, the amino acid substitutions are conservative amino acid substitutions.

In some embodiments, the codons of the non-lipidated variant have been optimized for increased expression. Codon optimization is known in the art. *See, e.g.*, Sastalla et al, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 75(7): 2099-2110 (2009) and Coleman et al, *Science*, vol. 320: 1784 (2008). In some embodiments, codon optimization includes matching the codon utilization of an amino acid sequence with the codon frequency of the host organism chosen while including and/or excluding specific DNA sequences. In some embodiments, codon optimization further includes minimizing the corresponding secondary mRNA structure to reduce translational impediments. In some embodiments, the N-terminal tail has been codon optimized to comprise any one of SEQ ID NO: 28, 30, 32, and 34. In some embodiments, the Gly/Ser stalk has been codon optimized to comprise any one of SEQ ID NO: 28, 30, 32, and 34.

In order that this invention may be better understood, the following examples are set forth. The examples are for the purpose of illustration only and are not to be construed as limiting the scope of the invention.

Immunogenic Composition Formulations

In certain embodiments, the immunogenic compositions of the invention further comprise at least one of an adjuvant, a buffer, a cryoprotectant, a salt, a divalent cation, a non-ionic detergent, an inhibitor of free radical oxidation, a diluent or a carrier.

The immunogenic compositions of the invention may further comprise one or more preservatives in addition to a plurality of meningococcal protein antigens and capsular polysaccharide-protein conjugates. The FDA requires that biological products in multiple-dose (multi-dose) vials contain a preservative, with only a few exceptions. Vaccine products containing preservatives include vaccines containing benzethonium chloride (anthrax), 2-phenoxyethanol (DTaP, HepA, Lyme, Polio (parenteral)), phenol (Pneumo, Typhoid (parenteral), Vaccinia) and thimerosal (DTaP, DT, Td, HepB, Hib, Influenza, JE, Mening, Pneumo, Rabies). Preservatives approved for use in injectable drugs include, e.g., chlorobutanol, m-cresol, methylparaben, propylparaben, 2-phenoxyethanol, benzethonium chloride, benzalkonium chloride, benzoic acid, benzyl alcohol, phenol, thimerosal and phenylmercuric nitrate.

Formulations of the invention may further comprise one or more of a buffer, a salt, a divalent cation, a non-ionic detergent, a cryoprotectant such as a sugar, and an anti-oxidant such as a free radical scavenger or chelating agent, or any multiple combination thereof. The choice of any one component, e.g., a chelator, may determine whether or not another component (e.g., a scavenger) is desirable. The final composition formulated for administration should be sterile and/or pyrogen free. The skilled artisan may empirically determine which combinations of these and other components will be optimal for inclusion in the preservative containing immunogenic compositions of the invention depending on a variety of factors such as the particular storage and administration conditions required.

In certain embodiments, a formulation of the invention which is compatible with parenteral administration comprises one or more physiologically acceptable buffers selected from, but not limited to, Tris (trimethamine), phosphate, acetate, borate, citrate, glycine, histidine and succinate. In certain embodiments, the formulation is buffered to within a pH range of about 6.0 to about 9.0, preferably from about 6.4 to about 7.4.

In certain embodiments, it may be desirable to adjust the pH of the immunogenic composition or formulation of the invention. The pH of a formulation of the invention may be adjusted using standard techniques in the art. The pH of the formulation may be adjusted to be between 3.0 and 8.0. In certain embodiments, the pH of the formulation may be, or may adjusted to be, between 3.0 and 6.0, 4.0 and 6.0, or 5.0 and 8.0. In other embodiments, the pH of the formulation may be, or may adjusted to be, about 3.0, about 3.5, about 4.0, about 4.5, about 5.0, about 5.5, about 5.8, about 6.0,

about 6.5, about 7.0, about 7.5, or about 8.0. In certain embodiments, the pH may be, or may adjusted to be, in a range from 4.5 to 7.5, or from 4.5 to 6.5, from 5.0 to 5.4, from 5.4 to 5.5, from 5.5 to 5.6, from 5.6 to 5.7, from 5.7 to 5.8, from 5.8 to 5.9, from 5.9 to 6.0, from 6.0 to 6.1, from 6.1 to 6.2, from 6.2 to 6.3, from 6.3 to 6.5, from 6.5 to 7.0, from 7.0 to 7.5 or from 7.5 to 8.0. In a specific embodiment, the pH of the formulation is about 5.8.

In certain embodiments, a formulation of the invention which is compatible with parenteral administration comprises one or more divalent cations, including but not limited to $MgCl_2$, $CaCl_2$ and $MnCl_2$, at a concentration ranging from about 0.1 mM to about 10 mM, with up to about 5 mM being preferred.

In certain embodiments, a formulation of the invention which is compatible with parenteral administration comprises one or more salts, including but not limited to sodium chloride, potassium chloride, sodium sulfate, and potassium sulfate, present at an ionic strength which is physiologically acceptable to the subject upon parenteral administration and included at a final concentration to produce a selected ionic strength or osmolarity in the final formulation. The final ionic strength or osmolality of the formulation will be determined by multiple components (e.g., ions from buffering compound(s) and other non-buffering salts. A preferred salt, NaCl, is present from a range of up to about 250 mM, with salt concentrations being selected to complement other components (e.g., sugars) so that the final total osmolarity of the formulation is compatible with parenteral administration (e.g., intramuscular or subcutaneous injection) and will promote long term stability of the immunogenic components of the immunogenic composition formulation over various temperature ranges. Salt-free formulations will tolerate increased ranges of the one or more selected cryoprotectants to maintain desired final osmolarity levels.

In certain embodiments, a formulation of the invention which is compatible with parenteral administration comprises one or more cryoprotectants selected from but not limited to disaccharides (e.g., lactose, maltose, sucrose or trehalose) and polyhydroxy hydrocarbons (e.g., dulcitol, glycerol, mannitol and sorbitol).

In certain embodiments, the osmolarity of the formulation is in a range of from about 200 mOs/L to about 800 mOs/L, with a preferred range of from about 250 mOs/L to about 500 mOs/L, or about 300 mOs/L - about 400 mOs/L. A salt-free formulation may contain, for example, from about 5% to about 25% sucrose, and preferably from

about 7% to about 15%, or about 10% to about 12% sucrose. Alternatively, a salt-free formulation may contain, for example, from about 3% to about 12% sorbitol, and preferably from about 4% to 7%, or about 5% to about 6% sorbitol. If salt such as sodium chloride is added, then the effective range of sucrose or sorbitol is relatively decreased. These and other such osmolality and osmolarity considerations are well within the skill of the art.

In certain embodiments, a formulation of the invention which is compatible with parenteral administration comprises one or more free radical oxidation inhibitors and/or chelating agents. A variety of free radical scavengers and chelators are known in the art and apply to the formulations and methods of use described herein. Examples include but are not limited to ethanol, EDTA, a EDTA/ethanol combination, triethanolamine, mannitol, histidine, glycerol, sodium citrate, inositol hexaphosphate, tripolyphosphate, ascorbic acid/ascorbate, succinic acid/succinate, malic acid/maleate, desferal, EDDHA and DTPA, and various combinations of two or more of the above. In certain embodiments, at least one non-reducing free radical scavenger may be added at a concentration that effectively enhances long term stability of the formulation. One or more free radical oxidation inhibitors/chelators may also be added in various combinations, such as a scavenger and a divalent cation. The choice of chelator will determine whether or not the addition of a scavenger is needed.

In certain embodiments, a formulation of the invention which is compatible with parenteral administration comprises one or more non-ionic surfactants, including but not limited to polyoxyethylene sorbitan fatty acid esters, Polysorbate-80 (TWEEN 80), Polysorbate-60 (TWEEN 60), Polysorbate-40 (TWEEN 40) and Polysorbate-20 (TWEEN 20), polyoxyethylene alkyl ethers, including but not limited to BRIJ 58, BRIJ 35, as well as others such as TRITON X-100; TRITON X-114, NP40, SPAN 85 and the PLURONIC series of non-ionic surfactants (e.g., PLURONIC 121), with preferred components Polysorbate-80 at a concentration from about 0.001% to about 2% (with up to about 0.25% being preferred) or Polysorbate-40 at a concentration from about 0.001% to 1% (with up to about 0.5% being preferred).

In certain embodiments, a formulation of the invention comprises one or more additional stabilizing agents suitable for parenteral administration, e.g., a reducing agent comprising at least one thiol (-SH) group (e.g., cysteine, N-acetyl cysteine, reduced glutathione, sodium thioglycolate, thiosulfate, monothioglycerol, or mixtures thereof).

Alternatively or optionally, preservative-containing immunogenic composition formulations of the invention may be further stabilized by removing oxygen from storage containers, protecting the formulation from light (e.g., by using amber glass containers).

Preservative-containing immunogenic composition formulations of the invention may comprise one or more pharmaceutically acceptable diluents, carriers or excipients, which includes any excipient that does not itself induce an immune response. Suitable excipients include but are not limited to macromolecules such as proteins, saccharides, polylactic acids, polyglycolic acids, polymeric amino acids, amino acid copolymers, sucrose (Paoletti et al, 2001, *Vaccine*, 19:2118), trehalose, lactose and lipid aggregates (such as oil droplets or liposomes). Such diluent, excipient, and/or carriers are well known to the skilled artisan. Pharmaceutically acceptable excipients are discussed, e.g., in Gennaro, 2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, ISBN:0683306472.

Compositions of the invention may be lyophilized or in aqueous form, i.e. solutions or suspensions. Liquid formulations may advantageously be administered directly from their packaged form and are thus ideal for injection without the need for reconstitution in aqueous medium as otherwise required for lyophilized compositions of the invention.

Direct delivery of immunogenic compositions of the present invention to a subject may be accomplished by parenteral administration (intramuscularly, intraperitoneally, intradermally, subcutaneously, intravenously, or to the interstitial space of a tissue); or by rectal, oral, vaginal, topical, transdermal, intranasal, ocular, aural, pulmonary or other mucosal administration. In a preferred embodiment, parenteral administration is by intramuscular injection, e.g., to the thigh or upper arm of the subject. Injection may be via a needle (e.g., a hypodermic needle), but needle free injection may alternatively be used. A typical intramuscular dose is 0.5mL. Compositions of the invention may be prepared in various forms, e.g., for injection either as liquid solutions or suspensions. In certain embodiments, the composition may be prepared as a powder or spray for pulmonary administration, e.g., in an inhaler. In other embodiments, the composition may be prepared as a suppository or pessary, or for nasal, aural or ocular administration, e.g., as a spray, drops, gel or powder.

Optimal amounts of components for a particular immunogenic composition may be ascertained by standard studies involving observation of appropriate immune

responses in subjects. Following an initial vaccination, subjects can receive one or several booster immunizations adequately spaced.

Packaging and Dosage Forms

Immunogenic compositions of the invention may be packaged in unit dose or multi-dose form (e.g. 2 doses, 4 doses, or more). For multi-dose forms, vials are typically but not necessarily preferred over pre-filled syringes. Suitable multi-dose formats include but are not limited to: 2 to 10 doses per container at 0.1 to 2 mL per dose. In certain embodiments, the dose is a 0.5 mL dose. See, e.g., International Patent Application WO2007/127668, which is incorporated by reference herein.

Compositions may be presented in vials or other suitable storage containers, or may be presented in pre-filled delivery devices, e.g., single or multiple component syringes, which may be supplied with or without needles. A syringe typically but need not necessarily contains a single dose of the preservative-containing immunogenic composition of the invention, although multi-dose, pre-filled syringes are also envisioned. Likewise, a vial may include a single dose but may alternatively include multiple doses.

Effective dosage volumes can be routinely established, but a typical dose of the composition for injection has a volume of 0.5 mL. In certain embodiments, the dose is formulated for administration to a human subject. In certain embodiments, the dose is formulated for administration to an adult, teen, adolescent, toddler or infant (i.e., no more than one year old) human subject and may in preferred embodiments be administered by injection.

Liquid immunogenic compositions of the invention are also suitable for reconstituting other immunogenic compositions which are presented in lyophilized form. Where an immunogenic composition is to be used for such extemporaneous reconstitution, the invention provides a kit with two or more vials, two or more ready-filled syringes, or one or more of each, with the contents of the syringe being used to reconstitute the contents of the vial prior to injection, or vice versa.

Alternatively, immunogenic compositions of the present invention may be lyophilized and reconstituted, e.g., using one of a multitude of methods for freeze drying well known in the art to form dry, regular shaped (e.g., spherical) particles, such as micropellets or microspheres, having particle characteristics such as mean diameter

sizes that may be selected and controlled by varying the exact methods used to prepare them. The immunogenic compositions may further comprise an adjuvant which may optionally be prepared with or contained in separate dry, regular shaped (e.g., spherical) particles such as micropellets or microspheres. In such embodiments, the present invention further provides an immunogenic composition kit comprising a first component that includes a stabilized, dry immunogenic composition, optionally further comprising one or more preservatives of the invention, and a second component comprising a sterile, aqueous solution for reconstitution of the first component. In certain embodiments, the aqueous solution comprises one or more preservatives, and may optionally comprise at least one adjuvant (see, e.g., WO2009/109550 (incorporated herein by reference).

In yet another embodiment, a container of the multi-dose format is selected from one or more of the group consisting of, but not limited to, general laboratory glassware, flasks, beakers, graduated cylinders, fermentors, bioreactors, tubings, pipes, bags, jars, vials, vial closures (e.g., a rubber stopper, a screw on cap), ampoules, syringes, dual or multi-chamber syringes, syringe stoppers, syringe plungers, rubber closures, plastic closures, glass closures, cartridges and disposable pens and the like. The container of the present invention is not limited by material of manufacture, and includes materials such as glass, metals (e.g., steel, stainless steel, aluminum, etc.) and polymers (e.g., thermoplastics, elastomers, thermoplastic-elastomers). In a particular embodiment, the container of the format is a 5 mL Schott Type 1 glass vial with a butyl stopper. The skilled artisan will appreciate that the format set forth above is by no means an exhaustive list, but merely serve as guidance to the artisan with respect to the variety of formats available for the present invention. Additional formats contemplated for use in the present invention may be found in published catalogues from laboratory equipment vendors and manufacturers such as United States Plastic Corp. (Lima, OH), VWR.

EXAMPLES

Example 1: Experimental Procedures

Serum bactericidal assay

Cynomolgus macaques (n = 5/group) were immunized intramuscularly with rLP2086 or rP2086 (A + B) proteins adsorbed to $AlPO_4$. Cynomolgus macaques are an example of non-human primates. Animals were vaccinated at weeks 0, 4 and 24, and ORF2086-specific IgG and functional antibody titers were determined at weeks 0, 4, 6 and 26. Serum ORF2086-specific IgG titers were determined against rLP2086A and B.

Functional antibody titers were examined by serum bactericidal assay (SBA) against *Neisseria meningitidis* strains expressing either LP2086 with sequences homologous or heterologous to those contained in the vaccine.

Serum bactericidal antibodies in macaques or rabbits immunized with ORF2086 vaccine were determined using SBAs with human complement. Rabbit immune sera or macaques immune sera were heat-inactivated to remove intrinsic complement activity and subsequently serially diluted 1:2 in Dulbecco's PBS with Ca2+ and Mg2+ (D-PBS) in a 96-well microtiter plate to test for serum bactericidal activity against *N. meningitidis* strains. Bacteria used in the assay were grown in GC media supplemented with Kellogg's supplement (GCK) and monitored by optical density at 650 nm. Bacteria were harvested for use in the assay at a final OD_{650} of 0.50-0.55, diluted in D-PBS and 1000–3000 CFU were added to the assay mixture with 20% human complement.

Human serum with no detectable bactericidal activity was used as the exogenous complement source. Complement sources were tested for suitability against each individual test strain. A complement source was used only if the number of bacteria surviving in controls without added immune sera was >75%. Ten unique complement sources were required to perform the SBAs described in this study.

After a 30 min incubation at 37°C with 5% CO_2, D-PBS was added to the reaction mixture and aliquots transferred to microfilter plates filled with 50% GCK media. The microfilter plates were filtered, incubated overnight at 37°C with 5% CO_2 and microcolonies were stained and quantified. The serum bactericidal titers were defined as the interpolated reciprocal serum dilution that yielded a 50% reduction in CFU compared to the CFU in control wells without immune sera. The SBA titer is defined as the reciprocal of the interpolated dilution of test serum that causes a 50% reduction in

bacterial counts after a 30min incubation at 37°C. Susceptibility to killing with ORF2086 immune sera was established if there was a 4-fold or greater rise in SBA titer for ORF2086 immune sera compared to the corresponding pre-immune sera. Sera that were negative against the assay strain at the starting dilution were assigned a titer of one half the limit of detection for the assay (i.e. 4).

Example 2: Cloning and Expression of Non-Lipidated ORF2086 Variants

The mature P2086 amino acid sequence corresponding to residues 27-286 from *N. meningitidis* strain M98250771 (A05) was originally derived from PCR amplification from genomic DNA. The forward primer, with a sequence of TGCCATATGAGCAGCGGAAGCGGAAG (SEQ ID NO: 22), annealed to the 5' sequence and contained an NdeI site for cloning. The reverse primer, with a sequence of CGGATCCCTACTGTTTGCCGGCGATGC (SEQ ID NO: 23), annealed to the 3' end of the gene and contained a termination codon TAG followed by restriction site BamHI. The 799 bp amplified fragment was first cloned into an intermediate vector PCR2.1 (Invitrogen, Carlesbac, CA) This plasmid was cleaved with NdeI and BamHI, and was ligated into expression vector pET9a (Novagen, Madison, WI) which had been cleaved with NdeI and BamHI. The resulting vector pLA100 (which includes SEQ ID NO: 54), expressed the mature Subfamily A05 P2086 from strain M98250771 without the N-terminal cysteine (see SEQ ID NO: 13 wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted or SEQ ID NO: 55) that would be present in the lipidated protein. BLR(DE3) *E. coli* host strain [F- ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm Δ(srl-recA)306::Tn10 (TetR) (DE3)] (Novagen) was used to obtain expression of fHBP.

The same cloning steps were used to prepare the B02, B03, B09, B22, B24, B44, A04, A12, and A22 N-terminal Cys-deleted variants. The N-terminal Cys-containing variants were also prepared by this same method using forward primers which also included the Cys codon (e.g. the first codon of SEQ ID NOs: 1-11). Based on the sequences provided herein, the skilled worker would be able to design forward and reverse primers for each of these variants. For example, the following primers were used to amplify the B44 non-lipidated variant followed by cloning into pET9a using NdeI and BlpI.

Table 1

N-terminal Cys	Primer Sequence	SEQ ID NO
Included—Fwd	5' TTTCTTcccgggAAGGAGatatacatatg TGCAGCAGCGGAGGCGGCGG 3'	24
Included—Rev	5' TTTCTTgctcagcaTTATTGC TTGGCGGCAAGACCGAT 3'	25
Deleted—Fwd	5' TTTCTTcccgggAAGGAGatatacatatg AGCAGCGGAGGCGGCGG 3'	26
Deleted—Rev	5' TTTCTTgctcagcaTTATTGC TTGGCGGCAAGACCGAT 3'	27

Results

Non-lipidated plasmid constructs were strongly expressed, but the non-lipidated protein variants were pyruvylated at the N-terminal Cys residue. See Examples 8 and 9, which describes, for example, a method for expressing the constructs. To overcome this pyruvylation, the N-terminal Cys codon was deleted. See, for example, Example 10. Deletion of the N-terminal Cys, however, abrogated expression of the A22 and B22 variants. *See e.g.*, Figure 4. The A05, B01, and B44 variants, however, were still expressed despite deletion of the N-terminal Cys residue. See, for example, SEQ ID NO: 13 (A05), wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted, SEQ ID NO: 35 (B01 N-terminus), and SEQ ID NO: 21(B44),wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted. *See e.g.*, Figure 5. In addition, expression of the non-lipidated B09 variant was not affected by deletion of the N-terminal Cys residue. See, for example, Example 4.

Example 3: Effect of Gly/Ser Stalk on Non-Lipidated Variant Expression

To determine why the A05, B01, and B44 variants were expressed in the absence of the N-terminal Cys and the A22 and B22 variants were not, the sequences of these variants were aligned. The A05, B01, and B44 variants all possess an extended series of 10 or 11 Gly and Ser residues immediately following the N-terminal Cys (i.e. Gly/Ser stalk). The A22 and B22 variants, however, only had a Gly/Ser stalk consisting of 6 Gly and Ser residues. Accordingly, the Gly/Ser stalk of the A22 and B22 variants was expanded by insertion of additional Gly and Ser residues.

Long Gly/Ser stalk variants were prepared by the methods described in Example 2 using forward primers that encode a Gly/Ser stalk with either 10 or 11 Gly and Ser residues.

The N-terminal Cys-deleted, long Gly/Ser stalk (10-11 Gly/Ser residues) A22 and B22 variants showed increased expression over the N-terminal Cys-deleted A22 and B22 short Gly/Ser stalk (6 Gly/Ser residues) variants. These expression levels, however, were still reduced compared to the A05, B01, and B44 variant expression levels.

Example 4: Codon Optimization

Expression of the non-lipidated B09 variant was not affected by deletion of the N-terminal Cys residue (see SEQ ID NO: 18, wherein the cysteine at position 1 is deleted, or SEQ ID NO: 49). *See, e.g.*, Figure 6. Sequence evaluation of the B09 variant demonstrated that the B09 variant has a Gly/Ser stalk consisting of 6 Gly and Ser residues, similar to the Gly/Ser stalk of the A22 and B22 variants. Indeed, the N-terminal tails of the B09 and A22 variants are identical at the amino acid level. The N-terminal tails of the B09 and A22 variants (SEQ ID NO: 53 and 42, respectively), however, vary at the nucleic acid level by 2 nucleic acids: nucleic acids 15 and 39 of SEQ ID NO: 8. *See e.g.*, Figure 6. The first 14 amino acids of the N-terminal tail of the B22 variant are identical to the B09 and A22 variants, and the N-terminal tail of the B22 variant only differs at the 15th amino acid. Nucleic acids 1-42 of the B22 variant are identical to nucleic acids 1-42 of the A22 variant. Nucleic acids 1-42 of the B22 variant (see SEQ ID NO: 52) are identical to nucleic acids 1-42 of B09 (see SEQ ID NO: 53) but for differences at nucleic acids 15 and 39, when optimally aligned. Accordingly, the B22 variant differs from the B09 variant at amino acids 15 and 39 of SEQ ID NO: 8. This last

sentence contains a typographical error and should state that the B22 variant differs from the B09 variant at nucleic acids 15 and 39 of SEQ ID NO: 8.

To determine if the nucleic acid differences affected the expression level of the B09 variant compared to the A22 and B22 variants, the A22 and B22 variants were mutated by point mutation to incorporate nucleic acids 15 and 39 into the corresponding codons for Gly5 and Gly13. Incorporation of these silent nucleic acid mutations significantly increased expression of the A22 and B22 N-terminal Cys-deleted variants to levels similar to the N-terminal Cys-deleted B09 variant. *See e.g.*, Figure 7. Accordingly, codon optimization to match the B09 variant can increase expression of N-terminal Cys-deleted non-lipidated P2086 variants.

Further analysis of the non-lipidated variant sequences suggested additional codon optimizations in the Gly/Ser stalk to improve expression. Accordingly, additional non-lipidated variants were constructed by the method of Example 2 using forward primers comprising such codon optimized sequences. The forward primers used to generate optimized Gly/Ser stalks include any of the following sequences:

ATGAGCTCTGGAGGTGGAGGAAGCGGGGGCGGTGGA (SEQ ID NO: 28)
M S S G G G G S G G G G (SEQ ID NO: 29)

ATGAGCTCTGGAAGCGGAAGCGGGGGCGGTGGA (SEQ ID NO: 30)
M S S G S G S G G G G (SEQ ID NO: 31)

ATGAGCTCTGGAGGTGGAGGA (SEQ ID NO: 32)
M S S G G G G (SEQ ID NO: 33)

ATGAGCAGCGGGGGCGGTGGA (SEQ ID NO: 34)
M S S G G G G (SEQ ID NO: 33)

Example 5: Immunogenic Composition Formulation Optimization

ISCOMATRIX formulated vaccines generate a rapid immune response resulting in a reduction in the number of dosages required to achieve a greater than 4 fold response rate as measured in a serum bactericidal assay. Groups of five rhesus macaques were immunized with different formulations of a bivalent non-lipidated rP2086 vaccine. The vaccine included a non-pyruvylated non-lipidated A05 variant (SEQ ID NO: 13 wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted or SEQ ID NO: 55 encoded by SEQ ID NO: 54) and a non-pyruvylated non-lipidated B44 variant (SEQ ID NO: 21 wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted or SEQ ID NO: 44 encoded by SEQ ID NO: 51). The adjuvant units are as follows: $AlPO_4$ is 250 mcg, ISCOMATRIX is between 10 and 100 mcg. The adjuvant units for $AlPO_4$ shown in Tables 2-5 are shown as milligram units, and are therefore shown as 0.25 (milligram) as opposed to 250 mcg.

The immunization schedule was 0, 4 and 24 wks with bleeds at 0, 4, 6 and 26 weeks. There were no increases in SBA titers at post dose one for any of the groups. At post dose two, an increase in SBA titers and the number of responders as defined by a 4 fold increase in SBA titer above baseline was observed for formulations containing the ISCOMATRIX adjuvant. Tables 2 and 3 provide the SBA GMTs observed for a fHBP Subfamily A and B strain respectively. SBA GMTs for the ISCOMATRIX formulations were 3-19 and 4 - 2 4 fold higher than those observed for the AIPO4 formulation for the A and B subfamily strains respectively. Enhanced titers were also observed at post dose three for the ISCOMATRIX formulations at 13-95 and 2 - 10 for a fHBP Subfamily A and B strain respectively compared to the AIPO4 formulation. Analysis of the responder rates, as defined by a four fold or greater increase in SBA titer over baseline revealed a similar trend (Tables 4 and 5).

Table 2: SBA titers (GMTs) obtained for against a MnB LP2086 Subfamily A strain
immune serum from rhesus macaques immunized with different formulations of a bivalent
rP2086 vaccine

Vaccine	lipidation	Adjuvant		Geometric Mean titer (GMT)			
		AIPO4	ISCOMATRIX®	wk0	wk4	wk6	wk26
A05/B44	-	0.25	-	-	-	-	+
		-	10	-	-	+	+++
		0.25	10	-	-	+	++
		-	100	-	-	++	++++
		0.25	100	-	-	+	+++

Five monkeys per group; Immunization schedule: 0, 4, 24 weeks; bleed schedule 0, 4, 6 and 26 wks. SBA test strain MnB M98 250771.
"-" < 8; "+" 8-32; "++" 33-128; "+++" 129-512; "++++" >512

Table 3: SBA titers (GMTs) obtained for against a MnB LP2086 Subfamily B strain
immune serum from rhesus macaques immunized with different formulations of a bivalent
rP2086 vaccine

Vaccine	lipidation	Adjuvant		Geometric Mean titer (GMT)			
		AIPO4	ISCOMATRIX®	wk0	wk4	wk6	wk26
A05/B44	-	0.25	-	-	-	+	+++
		-	10	-	-	+++	++++
		0.25	10	-	-	+++	++++
		-	100	-	-	+++	++++
		0.25	100	-	-	++	++++

Five monkeys per group; Immunization schedule: 0, 4, 24 weeks; bleed schedule 0, 4, 6 and 26 wks. SBA test strain MnB CDC1127.
"-" < 8; "+" 8-32; "++" 33-128; "+++" 129-512; "++++" >512

Table 4: Number of rhesus macaques with a ≥4 fold rise in SBA Titer using a MnB
LP2086 Subfamily A strain

Vaccine	lipidation	Adjuvant		No. of responders[b]			
		AIPO4	ISCOMATRIX®	wk0	wk4	wk6	wk26
A05/B44	-	0.25	-	0	0	0	2
		-	10	0	0	3	5
		0.25	10	0	0	2	5
		-	100	0	0	4	5
		0.25	100	0	0	2	5

Table 5: Number of rhesus macaques with a ≥4 fold rise in SBA Titer using a MnB LP2086 Subfamily B strain

Vaccine	lipidation	Adjuvant		No. of responders[b]			
		AlPO4	ISCOMATRIX®	wk0	wk4	wk6	wk26
A05/B44	-	0.25	-	0	0	3	5
		-	10	0	0	5	5
		0.25	10	0	0	5	5
		-	100	0	0	4	4
		0.25	100	0	0	3	5

Example 6: Immunoprotection conferred by Lipidated and Non-Lipidated Variants

A recombinantly expressed non-lipidated P2086 variant (B44) induces broad protection as measured by SBA against strains that represent diverse fHBP variants (from about 85% to about <92% ID) LP2086 sequences. These response rates were obtained for a non lipidated vaccine formulated with $AlPO_4$. See Table 6, which shows SBA response rates to a subfamily B fHBP MnB strain generated by a bivalent fHBP vaccine. The non-lipidated vaccine (represented by a "-" under the "lipidation" column) included 1mcg per protein of a non-pyruvylated non-lipidated A05 variant (SEQ ID NO: 13 wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted) and a non-pyruvylated non-lipidated B44 variant (SEQ ID NO: 21 wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted) .

Alternatively, a recombinantly expressed non-lipidated P2086 variant (B44) induces greater immune responses as measured by SBA titer than a lipidated variant (B01) against strains bearing similar (>92% ID) and diverse (<92% ID) LP2086 sequences. Higher response rates (as defined by a four fold increase or greater in SBA titers over baseline) was observed for the vaccine containing the non-lipidated rP2086 B44 compared to the lipidated rLP2086 B01 vaccine (Table 6).

According to Table 6, non-lipidated B44 is a preferred subfamily B component of fHBP in a composition for providing broad coverage against (e.g., eliciting bactericidal antibodies against) multiple LP2086 variant strains.

Surprisingly, the inventors noted that LP2086 B09 variant strains are particularly unlikely to have positive SBA response rates with regard to heterologous (non-B09) ORF2086 polypeptides. In particular, the inventors found that LP2086 B09 is an exception in terms of an assay strain against which the A05/B44 immunogenic composition described in Table 6 elicited bactericidal antibodies. Therefore, in a preferred embodiment an immunogenic composition of the invention includes a B09 polypeptide, in particular in the context of a composition including more than one ORF2086 subfamily B polypeptide. In a preferred embodiment an immunogenic composition that includes a non lipidated B44 may also include a non-lipidated B09 polypeptide.

Table 6: SBA response rates to a Subfamily B fHBP MnB strains generated by bivalent fHBP vaccines Immune serum from rhesus macaques.

Adjuvant	LP2086 Variant of Assay Strain	Vaccine	lipidation	% ID to Matched Subfamilyfor non-lipidated Vaccine Component	% responders PD3 Wk 26
	B02	A05/B01	+	**99.6**	80
		A05/B44	-		**100**
AIPO4 0.25mg	B03	A05/B01	+	**86.7**	50
		A05/B44	-		**80**
	B09	A05/B01	+	**86.3**	0
		A05/B44	-		**0**
	B15	A05/B01	+	**86.7**	25
		A05/B44	-		**80**
	B16	A05/B01	+	**87.1**	0
		A05/B44	-		**50**
	B16	A05/B01	+	**87.1**	0
		A05/B44	-		**60**
	B24	A05/B01	+	**85.9**	0
		A05/B44	-		**60**
	B44	A05/B01	+	**100**	100
		A05/B44	-		**100**
ISCOMATRIX® (10 mcg)	A05	**A05/B44**	-	**100**	**100**
ISCOMATRIX® (100 mcg)	A05	**A05/B44**	-	**100**	**100**
ISCOMATRIX® (10 mcg)	A22	**A05/B44**	-	**88.9**	**80**
ISCOMATRIX® (100 mcg)	A22	**A05/B44**	-	**88.9**	**100**

Five monkeys per group; Immunization schedule: 0, 4, 24 weeks; bleed schedule 0, 4, 6, and 26 wks.

Example 7: Codon Optimization of the B44 and B09 Variants

Although the expression levels achieved in the preceding examples were adequate for many applications, further optimization was desirable, and *E. coli* expression constructs containing additional codon optimization over the full length of the protein were prepared and tested. One such improved sequence for expression of a non-Cys B44 protein was found to be the nucleic acid sequence set forth in SEQ ID NO: 43. As shown in Example 9, the expression construct containing SEQ ID NO: 43 showed enhanced expression compared to that of the non-optimized wild type sequence.

Expression of the N-terminal Cys deleted B09 protein was improved by applying codon changes from the above optimized B44 (SEQ ID NO: 43) construct to B09 (SEQ ID NO: 48). To generate optimized B09 sequences, the B44 optimized DNA sequence (SEQ ID NO: 43) was first aligned to the DNA sequence of the B09 allele (SEQ ID NO: 48). The entire non-lipidated coding sequence of the B09 allele (SEQ ID NO: 48) was optimized to reflect the codon changes seen in the B44 optimized allele (SEQ ID NO: 43) wherever the amino acids between B44 (SEQ ID NO: 44) and B09 (SEQ ID NO: 49) were identical. Codon sequences in the B09 allele corresponding to the identical amino acids between the B09 allele and the B44 allele were changed to reflect the codon used in the B44 optimized sequence (SEQ ID NO: 43). Codon sequences for amino acids that differ between B09 (SEQ ID NO: 49) and B44 (SEQ ID NO: 44) were not changed in the B09 DNA sequence.

Additionally, the non-lipidated B44 amino acid sequence (SEQ ID NO: 44) contains two sequential serine-glycine repeat sequences (S-G-G-G-G)(SEQ ID NO: 56)(see also amino acids 2 to 6 of SEQ ID NO: 44) at its N-terminus, whereas the B09 allele contains only one serine-glycine repeat at the N-terminus (see amino acids 2 to 6 and amino acids 7 to 11 of SEQ ID NO: 49). The two serine-glycine repeats at the N-terminus of B44 (amino acids 2 to 6 and amino acids 7 to 11 of SEQ ID NO: 44) also have different codon usage (see nucleotides 4 to 18 and nucleotides 19 to 33 of SEQ ID NO: 43), and different combinations of the optimized B44 serine-glycine repeat (e.g., either nucleotides 4 to 18 of SEQ ID NO: 43, or nucleotides 19 to 33 of SEQ ID NO: 43, or a combination thereof) were applied to the B09 DNA sequence (SEQ ID NO: 48, e.g., applied to nucleotides 4 to 18 of SEQ ID NO: 48) in order to examine the effect on recombinant protein expression.

Three different versions of optimized B09 were constructed: SEQ ID NO: 45 contains both serine-glycine repeats (GS1 and GS2) (nucleic acids 4 to 33 of SEQ ID NO: 43) from the optimized B44, SEQ ID NO: 46 contains GS1 (nucleic acids 4 to 18 of SEQ ID NO: 43), and SEQ ID NO: 47 contains GS2 (nucleic acids 19 to 33 of SEQ ID NO: 43). The DNA for all of the above codon optimized sequences were chemically synthesized using standard in the art chemistry. The resulting DNA was cloned into appropriate plasmid expression vectors and tested for expression in *E. coli* host cells as described in Examples 8 and 9.

Example 8: Method for Expressing ORF2086, B09 variant

Cells of *E. coli* K-12 strain (derivatives of wild-type W3110 (CGSC4474) having deletions in *recA*, *fhuA* and *araA*) were transformed with plasmid pEB063, which includes SEQ ID NO: 45, pEB064, which includes SEQ ID NO: 46, plasmid pEB065, which includes SEQ ID NO: 47, or plasmid pLA134, which includes SEQ ID NO: 48. The preferred modifications to the K-12 strain are helpful for fermentation purposes but are not required for expression of the proteins.

Cells were inoculated to a glucose-salts defined medium. After 8 hours of incubation at 37°C a linear glucose feed was applied and incubation was continued for an additional 3 hours. Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to the culture to a final concentration of 0.1 mM followed by 12 hours of incubation at 37°C. Cells were collected by centrifugation at 16,000xg for 10 minutes and lysed by addition of Easy-Lyse™ Cell Lysing Kit" from Lienco Technologies (St. Louis, MO) and loading buffer. The cleared lysates were analyzed for expression of B09 by Coomassie staining of SDS-PAGE gels and/or Western blot analysis with quantitation by a scanning densitometer. The results from scanning densitometry are below in Table 7:

Table 7: Expression data in *E. coli*

Protein	Host cell	Plasmid	Percentage of total cell protein at 12 hours post IPTG induction, as measured by SDS-PAGE, scanning desitometry
B09	*E. coli* K-12	pEB063 SEQ ID NO: 45	24%
B09	*E. coli* K-12	pEB065 SEQ ID NO: 47	12%
B09	*E. coli* K-12	pEB064 SEQ ID NO: 46	38%
B09	*E. coli* K-12	pLA134 SEQ ID NO: 48	13%

Example 9: Method for Expressing ORF2086, B44 variant

Cells of *E. coli* B strain (BLR(DE3), Novagen) were transformed with plasmid pLN056, which includes SEQ ID NO: 51. Cells of *E. coli* K-12 strain (derivative of wild-type W3110) were transformed with plasmid pDK087, which includes SEQ ID NO: 43. Cells were inoculated to a glucose-salts defined medium. After 8 hours of incubation at 37°C a linear glucose feed was applied and incubation was continued for an additional 3 hours. Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to the culture to a final concentration of 0.1 mM followed by 12 hours of incubation at 37°C. Cells were collected by centrifugation at16,000xg for 10 minutes and lysed by addition of Easy-Lyse™ Cell Lysing Kit" from Lienco Technologies (St. Louis, MO) and loading buffer. The supermatants were analyzed for expression of B09 by COOMASSIE staining of SDS-PAGE gels and/or Western blot analysis, with quantitation by a scanning densitometer. The results from scanning densitometry are below in Table 8:

Table 8: Expression data in *E. coli*

Protein	Host cell	Plasmid	Percentage of total cell protein at 12 hours post IPTG induction, as measured by SDS-PAGE, scanning desitometry.
B44	*E. coli* B	pLN056 SEQ ID NO: 51	1%
B44	*E. coli* K-12	pDK087 SEQ ID NO: 43	17%

Example 10: Pyruvylation

The present example demonstrates that the N-terminal Cys residue of non-lipidated ORF2086 proteins can become pyruvylated when expressed in, for example, *E. coli*.

Heterologous protein accumulation during production of variants A05 (SEQ ID NO: 13) and B44 (SEQ ID NO: 21) were monitored using reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). This separation was interfaced with a quadrupole time-of-flight mass spectrometer (QTOF-MS) to provide a means of monitoring formation of product related variants.

After being expressed in the *E. coli* B and/or K-12 host cells, products derived from these fermentations underwent a purification procedure during which a product modification was observed. Deconvolution of the mass spectra characterized the variants as exhibiting mass shifts of +70 Da, as compared to native products of 27640 and 27572 Da for A05 and B44, respectively.

Published literature indicated that a +70 Da mass shift had previously been observed in proteins and has been attributed to pyruvylation of the amino-terminal residue.

The presence and location of the pyruvate group was confirmed using the mass spectral fragmentation data (MS/MS). The data indicated that the modification was on an amino-terminal cysteine residue, i.e., amino acid at position 1, according to A05 and B44. For A05, the percentage of pyruvylated polypeptides was about 30%, as compared to the total number of A05 polypeptides (SEQ ID NO: 13). For B44 the percentage of pyruvylated polypeptides was about 25%, as compared to the total number of B44 polypeptides (SEQ ID NO: 21).

When A05 (SEQ ID NO: 13 wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted or SEQ ID NO: 55) and B44 variants (SEQ ID NO: 21 wherein the N-terminal Cys at position 1 is deleted or SEQ ID NO: 44), which do not contain an amino-terminal cysteine, were purified, there was no detectable pyruvylation (+70 Da).

Example 11: Immunogenicity of B09 and B44, individually and in combination

5 -10 groups of rhesus maccaques monkeys were immunized with B09 variant (SEQ ID NO: 49 encoded by SEQ ID NO: 48) or B44 variant (SEQ ID NO: 44 encoded by SEQ ID NO: 43), or the A05, B09 and B44 (SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 49 encoded by SEQ ID NO: 48, and SEQ ID NO: 44 encoded by SEQ ID NO: 43, respectively) formulated with 250 mcg of $AlPO_4$ per dose. The monkeys were vaccinated via the intramuscular route at weeks 0, 4 and 8 with 10 mcg each of non-lipidated fHBP alone or in combination as listed in Table 9 and 10. Both weeks 0 and 12 serum samples were analyzed in SBAs against MnB strains with either subfamily A or subfamily B fHBP variants. Responders were recorded as animals with a 4 x rise in titer. The B44 variant tested was the optimized construct (SEQ ID NO: 43) and the broad response rates that were observed in previous studies (table above) were maintained for the optimized construct (Table 9) the B44 vaccine alone or in combination with B09. The B09 vaccine alone (Table 10) could also generate broadly cross reactive immune responses (Table 10).

Table 9: Response rates obtained for non lipidated fHBP vaccines in rhesus macaques

Vaccine (10 mcg per protein;	% ≥ 4 X Rise Against Test Variant (PD3; 10 rhesus macaques per group)				
	A05 (SEQ ID NO: 13)	B44 (SEQ ID NO: 21)	B16 (SEQ ID NO: 60)	B24 (SEQ ID NO: 20)	B09 (SEQ ID NO: 18)
B44	0	80	30	40	30
B44 + B09 +A05	60	80	40	50	30

Rhesus macaques (n= 10) were immunized i.m. at weeks 0, 4 and 8 with 10 mcg each of non-lipidated fHBP alone or in combination as listed in the Vaccine column in formulation with 250 mcg of $AlPO_4$. Both weeks 0 and 10 serum samples were

analyzed in SBAs against the MnB strains listed in the table. Responders are recorded as animals with a 4 x rise in titer.

Table 9 indicates, for example, that a composition including a combination of non-pyruvylated non-lipidated B44, B09, and A05 showed higher cross-coverage against the test variants as compared to the cross-coverage from a composition including B44 alone. In view of results shown in the present application, including in particular Table 6 and Table 9 together, compositions including B44, B09 and A05 alone or in combination are preferred embodiments of the present invention. In particular, compositions including both B44 and B09 are disclosed. Such composition preferably further includes a subfamily A polypeptide, such as in particular A05.

Table 10: Response rates obtained for non lipidated fHBP B09 vaccine in rhesus macaques

Vaccine (10 mcg per protein)	% ≥ 4 X Rise Against Test Variant (PD3; 5 rhesus macaques per group)				
	A05	B44	B16	B24	B09
B09	40	60	40	60	60

Rhesus macaques (n= 5) were immunized i.m. at weeks 0, 4 and 8 with 10 mcg each of non-lipidated fHBP alone or in combination as listed in the Vaccine column in formulation with 250 mcg of $AlPO_4$. Both weeks 0 and 10 serum samples were analyzed in SBAs against the MnB strains listed in the table. Responders are recorded as animals with a 4 x rise in titer.

Example 12: Immunoprotection conferred by Lipidated and Non-Lipidated Variants construct

Twenty female New Zealand white rabbits, 2.5-3.5 kg, obtained from Charles River Canada, were pre-screened by whole cell ELISA and 10 animals were selected for this study based on their low background titers against the test strains representing fHBP variants B02 (SEQ ID NO: 16) and B44 (SEQ ID NO: 21) (Table 11). Group of three animals were i.m. immunized with 100 µg of each protein formulated with 50 µg ISCOMATRIX per 0.5 ml dose at weeks 0, 4 and 9 (Table 12). Group 1 was vaccinated with non-lipidated B44 (SEQ ID NO: 44). A control group was included that was vaccinated with lipidated B01 formulated with AlP04 (250 mcg) Rabbits were bled at weeks 0, 4, 9 and 10. Individual sera from week 10 were prepared and analyzed by serum bactericidal assay against multiple serogroup B meningococcal strains from the fHBP B subfamily.

Table 11: Rabbits Used in The Study

Species:	Rabbit
Strain:	New Zealand white
Source:[a]	Charles River Laboratory
No. of Animals Per Group:	3
Total No. of Animals:	9
Age and Sex:	Female
Weight:	2.5-3.5 kg

Table 12

Group	# of animals	Variant	lipidated	rfHBP (µg/0.5 ml dose)	ISCOMATRIX (µg/0.5 ml dose)	Aluminium Phosphate (µg/0.5 ml dose)
1	3	B44	-	100	50	
2	3	B01	-	100	50	
3	3	B01	+	100	-	100

Immunization schedule Weeks 0, 4, 9; Bleed schedule Weeks 0, 4, 9,10

Serum Bactericidal Assay (SBA): A microcolony-based serum bactericidal assay (SBA) against multiple serogroup B meningococcal strains (Table 13) was performed on individual serum samples. Human sera from donors were qualified as the complement source for the strain tested in the assay. Complement-mediated antibody-dependent bactericidal titers were interpolated and expressed as the reciprocal of the dilution of the test serum that killed 50% of the meningococcal cells in the assay. The limit of detection of the assay was an SBA titer of 4. An SBA titer of <4 was assigned number of 2. A ≥ 4-fold rise of SBA titers in the week 10 sera in comparison to the titers in the pre-bleed was calculated and compared.

Serum bactericidal antibody activity as measured in the SBA is the immunologic surrogate of protection against meningococcal disease. The ability of immunization with non-lipidated rfHBP to elicit bactericidal antibodies in rabbits was determined by SBA. SBA measures the level of antibodies in a serum sample by mimicking the complement-mediated bacterial lysis that occurs naturally. Rabbit serum samples collected from week 10 were analyzed by SBA against strains with a B44 fHBP or a B02 fHBP. As shown in Table 13 , one week after the third immunization (week 10), all serum samples displayed bactericidal activity against both test strains. (Table 13). The non-lipidated B44 (SEQ ID NO: 44) was more immunogenic than non-lipidated B01 in New Zealand Rabbits against these strains. The non lipidated B44 (SEQ ID NO: 44) formulated with the iscomatrix adjuvant gave comparable titers to the lipidated B01 formulated with aluminium phosphate against these strains. Rabbit pre-bleed sera showed generally no pre-existing bactericidal activity against the tested strains.

Table 13: Serum Bactericidal Activity against fHBP Subfamily B Strains in New Zealand White Rabbits Vaccinated with Recombinant Non-lipidated fHBP

	GMT SBA Titer against test variant	
Subfamily B variant (formulation)	B44 (SEQ ID NO: 21)	B02 (SEQ ID NO: 16)
Non lipidated B44 (SEQ ID NO: 44)(ISCOMATRIX)	6675	7140
Non lipidated B01 (ISCOMATRIX)	625	1052
Lipidated B01 ($AlPO_4$)	10099	10558

Example 13: Immunogenicity of six non-lipidated factor H binding proteins in New Zealand white rabbits.

Groups of 5 rabbits were immunized with non-lipidated fHBP variants as described in Table 14. Vaccines were administered at 0, 4 and 9 weeks. Rabbit serum samples collected from weeks 0 and 10 were analyzed by SBA against the strains with homologous and heterologous fHBP sequences. Table 14 shows the percent responders post the third immunization. One week after the third immunization (week 10), all serum samples displayed bactericidal activity against the homologous strains as well as other test strains from the same fHBP subfamily. Rabbits pre-bleed sera showed generally no pre-existing bactericidal activity against the tested strains.

Table 14: Post Dose Three Percent of Responders in New Zealand White Rabbits Vaccinated with Recombinant Non-lipidated fHBPs

MnB fHBP	Dose/0.5 mL	$AlPO_4$/0.5 mL	n	B09	B16	B24	B44	A05	A12	A22
A05	100 mcg	0.25 mg	5					100	80	100
A12	100 mcg	0.25 mg	5					100	100	100
A22	100 mcg	0.25 mg	5					80	80	80
B09	100 mcg	0.25 mg	5	100	80	60	80			
B22	100 mcg	0.25 mg	5	40	100	60	100			
B44	100 mcg	0.25 mg	5	0	60	40	100			
A05, A12, B22, B44	100 mcg each/400 mcg total	0.25 mg	5	100	100	60	100	100	100	100

MnB fHBP Proteins Used

A05	SEQ ID NO: 13, wherein the Cys at position 1 is deleted, or SEQ ID NO: 55 encoded by SEQ ID NO: 54
A12	SEQ ID NO: 14, wherein the Cys at position 1 is deleted
A22	SEQ ID NO: 15, wherein the Cys at position 1 is deleted

B09	SEQ ID NO: 18, wherein the Cys at position 1 is deleted, or SEQ ID NO: 49 encoded by SEQ ID NO: 48.
B22	SEQ ID NO: 19, wherein the Cys at position 1 is deleted
B44	SEQ ID NO: 21, wherein the Cys at position 1 is deleted, or SEQ ID NO: 44 encoded by SEQ ID NO: 51

Test variants in Table 14:

B09 (SEQ ID NO: 18)	B16 (SEQ ID NO: 60)	B24 (SEQ ID NO: 20)	B44 (SEQ ID NO: 21)	A05 (SEQ ID NO: 13)	A12 (SEQ ID NO: 14)	A22 (SEQ ID NO: 15)

Example 14:

>non-lipidated A05 (SEQ ID NO: 55)
SSGSGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAEK
TFKVGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIE
KINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDF
AAKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDR
AQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

>pEB042 (SEQ ID NO: 65)
ATGAGCTCTGGAAGCGGAAGCGGGGGCGGTGGAGTTGCAGCAGACATTGGAACA
GGATTAGCAGATGCACTGACGGCACCGTTGGATCATAAAGACAAAGGCTTGAAAT
CGCTTACCTTAGAAGATTCTATTTCACAAAATGGCACCCTTACCTTGTCCGCGCAA
GGCGCTGAAAAAACTTTTAAAGTCGGTGACAAAGATAATAGCTTAAATACAGGTAA
ACTCAAAAATGATAAAATCTCGCGTTTTGATTTCGTGCAAAAAATCGAAGTAGATGG
CCAAACCATTACATTAGCAAGCGGTGAATTCCAAATATATAAACAAGACCATTCAGC
AGTCGTTGCATTGCAAATTGAAAAAATCAACAACCCCGACAAAATCGACAGCCTGA
TAAACCAACGTTCCTTCCTTGTCAGCGGTTTGGGCGGTGAACATACAGCCTTCAAC
CAATTACCAAGCGGCAAAGCGGAGTATCACGGTAAAGCATTTAGCTCAGATGATGC
AGGCGGTAAATTAACTTATACAATTGACTTTGCAGCAAAACAAGGACATGGCAAAA
TTGAACATTTAAAAACACCCGAACAGAACGTAGAGCTCGCATCCGCAGAACTCAAA
GCAGATGAAAAATCACACGCAGTCATTTTGGGTGACACGCGCTACGGCAGCGAAG
AAAAAGGTACTTACCACTTAGCTCTTTTTGGCGACCGAGCTCAAGAAATCGCAGGT
AGCGCAACCGTAAAGATAAGGGAAAAGGTTCACGAAATTGGGATCGCGGGCAAAC
AATAA

>non-lipidated A12 (SEQ ID NO: 66)
SSGGGGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGA
EKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEK
INNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFT
KKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRA
QEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

>pEB043(SEQ ID NO: 67)
ATGAGCTCTGGAGGTGGAGGAAGCGGGGGCGGTGGAGTTGCAGCAGACATTGGA
GCAGGATTAGCAGATGCACTGACGGCACCGTTGGATCATAAAGACAAAAGTTTGC
AGTCGCTTACCTTAGATCAGTCTGTCAGGAAAAATGAGAAACTTAAGTTGGCGGCG
CAAGGCGCTGAAAAAACTTATGGAAACGGTGACAGCTTAAATACAGGTAAACTCAA
AAATGATAAAGTCTCGCGTTTTGATTTCATTCGTCAAATCGAAGTAGATGGCCAAAC
CATTACATTAGCAAGCGGTGAATTCCAAATATATAAACAAAACCATTCAGCAGTCGT
TGCATTGCAAATTGAAAAAATCAACAACCCCGACAAAATCGACAGCCTGATAAACC
AACGTTCCTTCCTTGTCAGCGGTTTGGGCGGTGAACATACAGCCTTCAACCAATTA
CCAGACGGCAAAGCGGAGTATCACGGTAAAGCATTTAGCTCAGATGATCCGAACG
GTAGGTTACACTATTCCATTGACTTTACCAAAAAACAAGGATACGGCAGAATTGAAC
ATTTAAAAACGCCCGAACAGAACGTAGAGCTCGCATCCGCAGAACTCAAAGCAGAT
GAAAAATCACACGCAGTCATTTTGGGTGACACGCGCTACGGCGGCGAAGAAAAAG
GTACTTACCACTTAGCCCTTTTTGGCGACCGCGCTCAAGAAATCGCAGGTAGCGC
AACCGTAAAGATAAGGGAAAAGGTTCACGAAATTGGGATCGCGGGCAAACAATAA

>non-lipidated A22 (SEQ ID NO: 68)

SSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGN
GDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKI
DSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHG
KIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSA
TVKIREKVHEIGIAGKQ

>pEB058 (SEQ ID NO: 69)

ATGAGCTCTGGAGGTGGAGGAGTTGCAGCAGACATTGGAGCAGGATTAGCAGATG
CACTGACGGCACCGTTGGATCATAAAGACAAAAGTTTGCAGTCGCTTACCTTAGAT
CAGTCTGTCAGGAAAAATGAGAAACTTAAGTTGGCGGCGCAAGGCGCTGAAAAAA
CTTATGGAAACGGTGACAGCTTAAATACAGGTAAACTCAAAAATGATAAAGTCTCG
CGTTTTGATTTCATTCGTCAAATCGAAGTAGATGGCCAACTTATTACATTAGAAAGC
GGTGAATTCCAAATATATAAACAAGACCATTCAGCAGTCGTTGCATTGCAAATTGAA
AAAATCAACAACCCCGACAAAATCGACAGCCTGATAAACCAACGTTCCTTCCTTGT
CAGCGGTTTGGGCGGTGAACATACAGCCTTCAACCAATTACCAAGCGGCAAAGCG
GAGTATCACGGTAAAGCATTTAGCTCAGATGATGCAGGCGGTAAATTAACTTATAC
AATTGACTTTGCAGCAAAACAAGGACATGGCAAAATTGAACATTTAAAAACACCCG
AACAGAACGTAGAGCTCGCATCCGCAGAACTCAAAGCAGATGAAAAATCACACGC
AGTCATTTTGGGTGACACGCGCTACGGCGGCGAAGAAAAAGGTACTTACCACTTA
GCTCTTTTTGGCGACCGAGCTCAAGAAATCGCAGGTAGCGCAACCGTAAAGATAA
GGGAAAAGGTTCACGAAATTGGGATCGCGGGCAAACAATAA

> A62 (SEQ ID NO: 70). GenBank: ACI46789.1

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTY
GNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQD
SEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAA
KQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQ
EIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

>non-lipidated A62 (SEQ ID NO: 71)

SSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYG
NGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDS
EDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAK
QGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEI
AGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

>pLA164 (SEQ ID NO: 72)

ATGAGCAGCGGAGGGGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGTGCGGGGCTTGCCGA
TGCACTAACCGCACCGCTCGACCATAAAGACAAAGGTTTGCAGTCTTTAACGCTGG
ATCAGTCCGTCAGGAAAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA
AACTTATGGAAACGGCGACAGCCTTAATACGGGCAAATTGAAGAACGACAAGGTC
AGCCGCTTCGACTTTATCCGTCAAATCGAAGTGGACGGGAAGCTCATTACCTTGGA
GAGCGGAGAGTTCCAAGTGTACAAACAAAGCCATTCCGCCTTAACCGCCCTTCAG
ACCGAGCAAGTACAAGACTCGGAGGATTCCGGGAAGATGGTTGCGAAACGCCAGT
TCAGAATCGGCGACATAGCGGGCGAACATACATCTTTTGACAAGCTTCCCAAAGG
CGGCAGTGCGACATATCGCGGGACGGCGTTCGGTTCAGACGATGCTGGCGGAAA
ACTGACCTATACTATAGATTTCGCCGCCAAACAGGGACACGGCAAAATCGAACACT
TGAAAACACCCGAGCAAAATGTCGAGCTTGCCTCCGCCGAACTCAAAGCAGATGA
AAAATCACACGCCGTCATTTTGGGCGACACGCGCTACGGCGGCGAAGAAAAAGGC
ACTTACCACCTCGCCCTTTTCGGCGACCGCGCCCAAGAAATCGCCGGCTCGGCAA
CCGTGAAGATAAGGGAAAAGGTTCACGAAATCGGCATCGCCGGCAAACAGTAA

> pDK086 (SEQ ID NO: 73)

ATGTCCAGCGGTTCAGGCAGCGGCGGTGGAGGCGTGGCAGCAGATATCGGAACA
GGTTTAGCAGATGCTCTGACAGCACCCTTAGATCACAAAGACAAAGGACTTAAATC
ACTGACATTGGAAGATTCTATCTCGCAAAATGGTACTCTCACTCTTTCAGCCCAAG
GCGCAGAAAAAACATTTAAAGTAGGCGATAAAGATAACTCCTTAAATACAGGTAAAT
TAAAAAATGACAAAATCTCACGGTTTGATTTCGTTCAGAAAATTGAAGTAGATGGAC
AAACGATTACATTAGCAAGCGGCGAATTCCAAATTTATAAACAAGACCATTCAGCA
GTAGTAGCATTACAAATCGAAAAAATTAACAACCCGGACAAAATTGATTCTCTTATT
AACCAACGCTCTTTTCTCGTATCAGGACTTGGTGGTGAACATACAGCGTTTAATCA
ACTGCCGTCAGGAAAAGCAGAATATCATGGTAAAGCATTTTCATCAGACGACGCAG
GTGGCAAACTGACCTATACTATTGACTTTGCAGCAAAACAGGGACATGGAAAAATT
GAACATTTAAAAACACCCGAACAGAACGTAGAACTGGCCTCAGCAGAATTGAAAGC
TGATGAAAAATCCCATGCAGTAATTTTAGGCGATACACGTTACGGTAGCGAAGAAA
AAGGTACATATCACTTAGCTCTTTTTGGCGATCGTGCTCAAGAAATTGCTGGTTCC
GCAACAGTTAAAATCCGTGAAAAAGTACATGAAATCGGCATTGCAGGTAAACAATA
A

>A29 (SEQ ID NO: 74)

CSSGGGGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGA
EKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVAL
QIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGDKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYT
IDFTNKQGYGRIEHLKTPELNVDLASAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFG
DRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>non-lipidated B22 (SEQ ID NO: 75)
SSGGGGVAADIGAVLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGN
GDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSE
HSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDASGKLTYTIDFAAKQ
GHGKIEHLKSPELNVDLAASDIKPDKKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVA
GSAEVETANGIRHIGLAAKQ

>non-lipidated A05 (SEQ ID NO: 76) (pPW102)
CGSSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAEKTF
KVGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKI
NNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAA
KQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQ
EIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

>non-lipidated A05 (SEQ ID NO: 77)
GSSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAEKTFK
VGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKIN
NPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAK
QGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEI
AGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

>Consensus (SEQ ID NO: 78)
CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTY
GNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQSHSALVALQTEQINNS
DKSGSLINQRSFRISGIAGEHTAFNQLPKGGKATYRGTAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQ
GHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIA
GSATVKIREKVHEIGIAGKQ

>Consensus (SEQ ID NO: 79)
SSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYG
NGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQSHSALVALQTEQINNSD
KSGSLINQRSFRISGIAGEHTAFNQLPKGGKATYRGTAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQG
HGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIAG
SATVKIREKVHEIGIAGKQ

Example 15: Generation of non-lipidated variants of subfamily A rP2086-Cloning of non lipidated fHBP genes

The coding sequence of non lipidated A05 fHBP protein (SEQ ID NO: 55) was aligned to an expression-optimized B44 sequence (SEQ ID NO: 43). Wherever the amino acids between the two were identical, the codon from the B44 (SEQ ID NO: 43) was used to substitute in the A05 gene. The optimized sequence was synthesized de novo at Celtek Genes, adding restriction endonuclease sites NdeI and BamHI at the N- and C-termini, respectively. The resulting gene (SEQ ID NO: 65) was subcloned into pET30a at those sites.

Recombinant non lipidated A12 fHBP (SEQ ID NO: 66) was expressed from pEB043 (SEQ ID NO: 67). The A12 allele was expression-optimized by Blue Heron Technologies. This gene was optimized by the same process as for A05 (pEB042). In addition, the Blue Heron optimized B44 SGGGGSGGGG (amino acid residues 2 to 11 of SEQ ID NO: 44) amino terminal codons replaced the native A12 SSGGGG (amino acid residues 1 to 6 of SEQ ID NO: 66) codons. The optimized sequence was synthesized de novo at Celtek Genes, adding restriction endonuclease sites *NdeI* and *BamHI* at the N- and C-termini, respectively. The resulting gene (SEQ ID NO: 67) was subcloned into pET30a at those sites.

Recombinant non lipidated A22 fHBP (SEQ ID NO: 68) was expressed from pEB058 (SEQ ID NO: 69). This gene was optimized by the same process as for pEB042. In addition, the Blue Heron optimized B44 SGGGG (amino acid residues 2 to 6 of SEQ ID NO: 44) amino terminal codons replaced the native A22 SSGGGG (amino acid residues 1 to 6 of SEQ ID NO: 68) codons. The optimized sequence was synthesized de novo at Celtek Genes, adding restriction endonuclease sites NdeI and BamHI at the N- and C-termini, respectively. The resulting gene (SEQ ID NO: 69) was subcloned into pET30a at those sites.

Recombinant A62 fHBP (SEQ ID NO: 71) was expressed from pLA164 (SEQ ID NO: 72). The A62_002 allele from strain 0167/03 was PCR amplified with primers containing restriction endonuclease sites NdeI and BamHI at the N- and C-termini, respectively. The resulting gene (SEQ ID NO: 72) was subcloned into pET30a at those sites.

Example 16: Expression, Fermentation, and Purification of Subfamily A rP2086 proteins *E. coli expression strains*

BLR(DE3) E. coli B recA- transformed with pLA164 (SEQ ID NO: 72) was used for expression of A62 (SEQ ID NO: 71). Plasmid pEB042 (SEQ ID NO: 65) was transformed to *E. coli* host BD643 (W3110:DE3 ΔrecA ΔfhuA ΔaraA) to give strain BD660 for expression of A05 (SEQ ID NO: 55). Expression of A22 (SEQ ID NO: 68) was from strain BD592 which consists of plasmid pEB058 (SEQ ID NO: 69) residing in host BD559 (which is also W3110:DE3 ΔrecA ΔfhuA ΔaraA). Lastly, plasmid pEB043 (SEQ ID NO: 67) was transformed to host BD483 (W3110:DE3 ΔrecA) to give strain BD540 for expression of A12 (SEQ ID NO: 66).

Fermentation

Expression strains were fermented in a glucose-based minimal medium. An overnight starter culture was inoculated to ten liter fermentors operated at 37°C, 1vvm aeration with cascade dO control at 20%. When batched glucose was exhausted from the medium (at ~OD_{600}=15) a limiting linear glucose feed at 3.8 g/L/hr was initiated. The feed was continued up to induction with 0.1mM IPTG and through the subsequent protein expression period. For expression of A05 (SEQ ID NO: 55), strain BD660 was induced at OD_{600}=25 and fermentation was continued through 7 hours post-induction (HPI). Expression of A22 (SEQ ID NO: 68) and A12 (SEQ ID NO: 66)from strains BD592 and BD540, respectively, was achieved by inducing at OD_{600}=40 and fermenting for 24 HPI. At the end of the fermentation, cell pastes were collected by centrifugation.

A62 (SEQ ID NO: 71)

rP2086 proteins are produced as soluble proteins in the cytoplasm of E.coli strains. The soluble cytoplasmic extract is typically obtained by thawing frozen cells expressing a particular variant of the subfamily A of rP2086 in hypotonic buffer (10mM Hepes-NaOH pH 7.4 containing protease inhibitors) and disrupting the cells in a Microfluidizer under ~20,000 psi. RNase and DNAse are added to digest nucleic acids and the cytoplasmic extract is collected as the supernatant following centrifugation at low speed to remove any unbroken cells and then high speed (≥100,000xg) to remove membranes, cell walls and other larger subcellular components. The cytoplasmic extract is further clarified by sequential adjustments to 25% then 50% saturated ammonium sulfate and removal of precipitated material after each adjustment by low

speed centrifugation. Low molecular weight ionic cell components are then removed by adsorbing the rP2086 in 50% ammonium saturated sulfate in a buffer of 10mM Hepes-NaOH pH7.4, 1mM Na_2EDTA to a hydrophobic interaction column (phenyl sepharose purchased from GE Healthcare) then eluting the rP2086 by linearly decreasing the ammonium sulfate concentration to 0% with a buffer of 10mM Hepes-NaOH pH7.4, 1mM Na_2EDTA. The majority of the negatively charged proteins are then removed by adjusting the rP2086 containing fractions to a buffer of 10mM Tris-HCl, pH 8.6, 1mM Na2EDTA passage of the pooled fractions over an anion exchange column (TMAE purchased from EMD) equilibrated with the same buffer. The rP2086 is then further purified by chromatography on ceramic hydroxyapatite (obtained from BioRad) by exchanging the buffer containing the rP2086 to 10mM Hepes-NaOH, pH7.4 containing 1mM sodium phosphate adsorbing the protein to the ceramic hydroxyapatite then eluting with a linear gradient of sodium phosphate to 250mM at pH 7.4. The unit operations listed above are often sufficient to yield purified rP2086 subfamily A members. However, since the expression level can vary over 10-fold, when the rP2086 is expressed at the lower end of the range or when ultra pure rP2086 is need (at high concentrations for NMR structural determinations) the following additional unit operations are added: chromatofocusing followed by ceramic hydroxyapatite chromatography. The buffer containing rP2086 protein from the earlier hydroxyapatite step is exchanged to 25mM Tris-acetate, pH8.3 and the protein is adsorbed to a chromatofocusing PBE94 column (obtained from GE Healthcare) equilibrated with the same buffer and then eluted with a buffer of polybuffer 94-acetate, pH 6. The rP2086 proteins will elute at their ~pI and the fractions containing the protein are pooled. The buffer of the rP2086 containing fractions is then exchanged to 10mM Hepes-NaOH pH7.4 containing 1mM sodium phosphate and adsorbed and eluted as above. The rP2086 subfamily A members prepared by this process are typically >95% homogeneous by SDS-PAGE analysis and most often >99% homogeneous.

A05, A12 and A22 (SEQ ID NOs: 55, 66, and 68, respectively)

At the end of fermentation, the cell slurry is recovered by continuous centrifugation and re-suspended to ~1/4 the original fermentation volume in 20 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 6.0. Lysis of the cell suspension is achieved by high-pressure homogenization (2 passes, 4000-9000 psi). To the homogenate is added DADMAC to a final concentration of 0.5%. The solution is stirred at 15-25 ºC for 60 minutes during which time a heavy precipitate forms. The solution is clarified by continuous centrifugation. The proteins (A05, A12 and A22) are purified using two chromatographic steps followed by a final buffer exchange. The pH of the centrate is adjusted to 5.5 and loaded onto a GigaCap-S column (CEX). The protein binds to the resin and is subsequently eluted using a sodium chloride gradient. To the pool from the CEX column is added sodium citrate to a final concentration of 1.5 M, and the solution is loaded onto a Phenyl-650M column (HIC). The protein binds to the resin and is subsequently eluted using a sodium citrate step gradient. The HIC pool containing purified protein is exchanged into the final drug substance buffer by diafiltration. A 5 kD regenerated cellulose acetate ultrafiltration cassette is utilized. The protein concentration is targeted to 1.5-2.0 mg/mL. The diafiltered retentate is filtered through a 0.2 micron filter prior to filling into the storage bottles. Drug substance is stored at -70ºC.

Example 17: Serum bactericidal assay

Functional antibody titers were examined by serum bactericidal assay (SBA) against wildtype or engineered *Neisseria meningitidis* serogroup B strains expressing fHBP either with sequences homologous or heterologous to those contained in the vaccine. Serum bactericidal antibodies in rabbits immunized with rP2086 vaccines were determined using SBAs with human complement. Rabbit immune sera was heat-inactivated to remove intrinsic complement activity and subsequently serially diluted two-fold in Dulbecco's PBS with Ca2+ and Mg2+ (D-PBS) in a 96-well microtiter plate to test for serum bactericidal activity against *N. meningitidis* strains. For combination studies with engineered strains, sera of interest was mixed in a 1:1 ratio before the serial dilution described above, so the effective concentration of each component was half that when each was tested individually. Bacteria used in the assay were grown in GC media supplemented with Kellogg's supplement (GCK) and monitored by optical density at 650 nm. Bacteria were harvested for use in the assay at a final OD_{650} of 0.50-0.55, diluted in D-PBS and 1000–3000 CFU were added to the assay mixture. Human serum with no detectable bactericidal activity was used as the exogenous complement source. Complement sources were tested for suitability against each individual test strain. For the isogenic strains, a single human serum was identified and qualified for SBAs against all isogenic strains. A complement source was used only if the number of bacteria surviving in controls without added immune sera was >75%. After a 30 minute incubation at 37°C with 5% CO_2 and an agitation of 700 rpm on a shaker, D-PBS was added to the reaction mixture and aliquots transferred to microfilter plates prefilled with 50% GCK media for the wild type strains and 100% GCK media for the engineered strains. The microfilter plates were filtered, incubated overnight at 37°C with 5% CO_2 and microcolonies were stained and quantified. The serum bactericidal titers were defined as the interpolated reciprocal serum dilution that yielded a 50% reduction in CFU compared to the CFU in control wells without immune sera. Susceptibility to killing by anti-rP2086 immune sera was established if there was a 4-fold or greater rise in SBA titer for anti-rP2086 immune sera compared to the corresponding pre-immune sera. Sera that were negative against the assay strain at the starting dilution were assigned a titer of one half the limit of detection for the assay.

Example 18: Immunogenicity of non-lipidated variants of rP2086 sub family A proteins

White New Zealand female rabbits (2.5-3.5 kg) obtained from Charles River (Canada) were used in two studies. For the first study, groups of 3 rabbits were immunized with either 30 mcg or 3 mcg each of either a lipidated A05 or a non-lipidated A05 fHBP formulation. For the second study, five rabbits/group were immunized intramuscularly at the right hind leg with with rP2086A variants at 20 µg/mL adjuvanted with 500 µg/mL of AlPO4 (0.5ml/dose/two sites). Animals were vaccinated at weeks 0, 4 and 9, bled at weeks 0 and 6 and exsanguinated at week 10. LP2086 specific bactericidal antibody titers were determined at weeks 0, 6 and 10.

The goal of these studies was to mimic the reduced responses that are observed for immunologically naïve populations such as infants. First we compared a low and high dosage (30 vs 3 mcg per antigen per dose) of vaccines containing either lipidated A05 (SEQ ID NO: 13) or non-lipidated A05 (SEQ ID NO: 55) (Tables 15 A and 15B). Low dosages were used so that differences in the response rate could be discerned between each vaccine. SBA analysis was conducted using two strain sets. The first set consisted of wildtype strains that had caused invasive disease. The second was a genetically engineered strain set that had the same strain background and differed only by the sequence of the fHBP being expressed as follows: the *N. menigitidis* strain PMB3556, which expresses a B24 variant of fHBP, was engineered such that its endogenous *fhbp* gene was replaced with genes encoding for other fHBP variants. The constructs were designed such that only the region encoding the ORF was "switched" and the surrounding genetic background was left intact. SBA analysis using this strain set therefore allowed for evaluation of reactivity against different subfamily A fHBP proteins expressed at the same level and in the same genetic background using one source of human complement. All strains had fHBP expression levels that were above the threshold identified by Jiang et al (2010). As shown in Tables 15A and 15B, both the high and low dose levels of the lipidated A05-containing vaccine elicited broad protection across the genetically diverse subfamily A variants, whereas reduced responses were observed at both doses for the vaccine containing the non-lipidated A05 variant. This side-by-side comparison therefore revealed that, although the non-lipidated A05 variant is cross protective across subfamily A expressing strains, it is not as immunogenic as the lipidated variant which is more likely to form a native configuration (Tables 15A and 15B).

For the subsequent study, the dose level was raised to 10 mcg per non-lipidated subfamily A variant to assess each for its potential to provide broad coverage against subfamily A strains. SBA analysis reveal that at this raised dose level sera from rabbits immunized with non-lipidated A05 (SEQ ID NO: 55), A62 (SEQ ID NO: 71), A12 (SEQ ID NO: 66) and A22 (SEQ ID NO: 68) fHBP variants all induced titers to wildtype strains expressing both homologous and heterologous subfamily A variants, indicating that all were cross-protective at this low dose within subfamily A. Therefore we observed that the N2C1 vaccine (A05) could generate antibodies that could kill the N1C2 (A22) and N2C2 (A12) variant strains and likewise vaccines from these other groups could kill strains with opposing variants. Under these conditions, it was observed that the A05 and A62 variants induced the highest SBA responder rates across strains (Table 16). Accordingly, this shows a protective effect across these variants.

Table 15A- Lipidated A05 formulation

			Geometric Mean SBA Titers					
			Lipidated A05 formulation					
			30 mcg dose			3 mcg dose		
	fHBP variant	strain name	pre	PD3	≥4xrise	pre	PD3	≥4xrise
Wildtype strains	A05	PMB1745	2	697	3	2	382	3
	A12	PMB258	5	406	3	2	99	3
	A22	PMB3570	2	956	3	3	185	3
	A62	PMB3037	2	959	3	2	50	3
Isogenic strains	A05	RD3040-A05	102	3424	3	38	583	3
	A12	RD3044-A12	15	1233	3	8	183	3
	A22	RD3042-A22	24	3289	3	6	582	3
	A29	RD3043-A29	63	4086	3	19	1359	3

Table 15B- Non-lipidated A05 formulation			Geometric Mean SBA Titers					
			Non-lipidated A05 formulation					
			30 mcg dose			3 mcg dose		
	fHBP variant	strain name	pre	PD3	≥4xrise	pre	PD3	≥4xrise
Wildtype strains	A05	PMB1745	2	1182	3	2	281	3
	A12	PMB258	5	31	2	6	23	1
	A22	PMB3570	2	76	3	2	11	2
	A62	PMB3037	2	35	2	2	2	0
Isogenic strains	A05	RD3040-A05	95	258	0	78	134	1
	A12	RD3044-A12	34	228	2	50	105	1
	A22	RD3042-A22	24	221	2	23	85	1
	A29	RD3043-A29	36	326	3	52	267	2

Tables 15A and 15B. Geometric Mean SBA Titers against *N. meningitidis* group B strains of sera taken pre and post (PD3 = 10 weeks) immunization of rabbits (n = 3) with either 30 or 3 mcg vaccines containing lipidated or non-lipidated A05. The upper panels (labeled "wildtype strains") of Tables 15A and 15B summarizes activity against clinical isolates. The lower panels (labeled "isogenic strains") of Tables 15 A and 15B summarizes activity against a set of isogenic strains which were engineered from the parental *N. meningitidis* strain (PMB3556) such that the entire ORF of its endogenous fHBP was replaced with either A05 (SEQ ID NO: 13), A22 (SEQ ID NO: 15), A29 (SEQ ID NO: 74) or A12 (SEQ ID NO: 14) variants.

	Percent of Responders with >4 fold rise				
vaccine	A05	A62	A12	A22	average
A62	100	100	60	60	80
A05	80	80	60	80	75
A12	60	80	60	60	65
A22	60	60	40	40	50

Table 16. The percentage of responders demonstrating at least 4-fold rise in SBA GMT levels over background from 10 week sera taken from rabbits immunized with 10 mcg of non-lipidated A subfamily fHBP variants against strains expressing A05, A62, A12 or A22 fHBP variants.

Cross-protection was also observed for all variants using the isogenic strain set described above at the increased dose of 10 mcg, with sera from rabbits immunized with the A62 variant (SEQ ID NO: 71) demonstrating the most cross-reactivity, followed by A05 anti-sera (Table 17). In addition, sera from rabbits immunized with the A62 variant (SEQ ID NO: 71) showed reactivity to both the parental PMB3556 strain and the B09 switched strain (Table 18), indicating that cross-reactivity activity extends to subfamily B proteins. A62 appears to be composed of both subfamily A (A22) and subfamily B (B09) domains (Figure 9).

	Geometric Mean SBA Titers vs. Isogenic Strain Set											
	RD3040-A05		RD3042-A22		RD3043-A29		RD3044-A12		PMB3556 (B24 parent)		KA3011	
Vaccine	pre	PD3	pre	PD3	pre	PD3	pre	PD3	pre	PD3	pre	PD3
A62	17	36	31	69	4	95	23	45	44	109	4	2
A05	7	67	5	64	20	132	16	58	34	40	3	2
A12	12	40	8	34	3	40	25	149	27	46	3	2
A22	9	46	13	36	5	30	13	38	28	34	4	2

	Percent of Responders (≥4-fold rise)					
Vaccine	RD3040-A05	RD3042-A22	RD3043-A29	RD3044-A12	PMB3556	KA3011
A62	40	80	100	40	40	0
A05	80	80	60	40	0	0
A12	40	40	60	60	20	0
A22	80	40	60	60	20	0

Table 17. Isogenic "switched" strains were engineered from the parental *N. meningitidis* strain (PMB3556) such that the entire ORF of its endogenous fHBP (a B24 variant) was replaced with either A05 (SEQ ID NO: 13), A22(SEQ ID NO: 15), A29 (SEQ ID NO: 74) or A12 (SEQ ID NO: 14) variants. KA3011 is a negative control strain (i.e. the parental PMB3556 whose *fhbp* gene has been deleted). The Geometric Mean SBA Titers (n = 5) of sera (taken before or 10 weeks after immunization of rabbits with three doses of 10 mcg non-lipidated A subfamily fHBP variants) against these strains is shown in the upper panel. The percentage of responders demonstrating at least a 4-fold rise in response over background is shown in the lower panel.

	Geometric mean SBA titers against isogenic subfamily B strains					
	PMB3556 (parent)			RD30337-B09		
Vaccine	pre	PD3	%responders (>4-fold rise)	pre	PD3	%responders (>4-fold rise)
A62	44	109	60	31	163	60
A05	34	40	0	32	28	0
A12	27	46	20	19	23	20
A22	28	34	0	29	30	0

Table 18. The Geometric Mean SBA Titers of sera (taken before or 10 weeks after immunization of rabbits (n = 5) with 10 mcg non-lipidated subfamily A proteins (A62 (SEQ ID NO: 71); A05 (SEQ ID NO: 55); A12 (SEQ ID NO: 66); A22 (SEQ ID NO: 68)) against two subfamily B isogenic strains.

Example 19: Evaluation of the effect of combining sera raised against non-lipidated subfamily A proteins on SBA

Combinations of serum were assessed to evaluate the effect on the breath of coverage. Paired pre vs post vaccination serum were tested to confirm that there was no non-specific killing induced as a result of combining the serum. The GM fold rise was calculated for the individual sera and for the combinations of serum across the 4 isogenic strains that represented diversity within subfamily A. Fold rise increases were detected for some of the combinations tested providing evidence that the breadth of coverage can be increased by including more subfamily A variants (Table 19). Optimal combinations appear to be A05 (SEQ ID NO: 55) with A62 (SEQ ID NO: 71) or A62 (SEQ ID NO: 71) with A12 (SEQ ID NO: 66) (Table 20).

	BC50 titer								
	A05			A12			A62		
	AQ508-5			AQ509-4			AQ507-5		
Strain	Wk0	Wk10	Fold rise	Wk0	Wk10	Fold rise	Wk0	Wk10	Fold rise
RD3040-A05	2	98	49	2	65	33	3	14	5
RD3042-A22	2	116	58	2	94	47	2	81	40
RD3043-A29	3	368	123	2	198	99	5	54	11
RD3044-A12	2	37	19	3	486	162	3	45	15
GM fold rise			50			70			13
KA3011	2	2	1	2	2	1	9	5	1

	BC50 titer								
	A05 + A12			A05 + A62			A12 + A62		
	AQ508-5 + AQ509-4			AQ508-5 + AQ507-5			AQ509-4 + AQ507-5		
Strain	Wk0	Wk10	Fold rise	Wk0	Wk10	Fold rise	Wk0	Wk10	Fold rise
RD3040-A05	7	170	24	8	107	13	2	97	49
RD3042-A22	6	3418	570	6	160	27	2	181	91
RD3043-A29	2	509	255	7	1181	169	6	478	80
RD3044-A12	8	335	42	5	1302	260	7	3707	530
GM fold rise			110			63			117
KA3011	13	2	0	2	5	3	7	5	1

Table 19. SBA Titers of sera from the highest responders of each vaccine group were retested against the isogenic strain set as shown in Table 17. Sera was tested in one to one mixtures to determine the extent of synergistic activity.

Combination	Fold Rise Increase for Combination Vaccine vs Monovalent		
	A05	A12	A62
A05 (SEQ ID NO: 55) + A12(SEQ ID NO: 66)	2.2	1.6	
A05 (SEQ ID NO: 55) + A62 (SEQ ID NO: 71)	1.3		4.8
A12 (SEQ ID NO: 66)+ A62 (SEQ ID NO: 71)		1.7	8.9

Table 20. The fold rise increase for sera tested in combination as compared to each tested alone (calculated from Table 19).

The results presented above in Examples 18-19 show that non-lipidated subfamily A proteins are immunogenic and may provide protection against infection with *N. meningitidis* strains bearing either homologous or heterologous variants. The data presented here illustrates that selected non-lipidated subfamily A variants retain immunogenicity and provide cross-protection against heterologous strains, though these responses are lower than the lipidated variants. We also demonstrate that the A62 (SEQ ID NO: 71) rP2086 antigen, having sequence similarity to subfamily B (see, for example, Figure 9), may protect across the subfamilies because the A62 (SEQ ID NO: 71) vaccine may kill strains expressing subfamily B variants B09 or B24).

The data presented above shows that not only are non-lipidated subfamily A variants capable of the type of synergy observed with combinations of lipidated fHBP, but also that they may provide coverage against B subfamily variants.

Example 20: Evaluation of immunogenicity of the combination of factor H binding proteins and tetravalent meningococcal conjugate vaccine in New Zealand white rabbits

The study was carried out in New Zealand White rabbits in the 2.5-3.5 kg range obtained from Charles River, Canada (Table 21). Prior to entering the study, 55 rabbits were pre-screened for existing antibodies using whole cell ELISAs against strains A05 and B02. After the screening, the rabbits with relatively low antibody titers (specific IgG titers <350) were vaccinated intramuscularly at the hind legs, 0.5 mL per site (1.0mL per dose, see Table 22) at weeks 0, 4, and 9. There were three rabbits per group. Rabbits were bled at weeks 0, 4, 6, 9, and exsanguinated at week 10. Serum samples were prepared and week 0 and 10 serum samples were analyzed by SBA. The meningococcal conjugate vaccine (MENVEO®, meningococcal (Groups A, C, Y and W-135) oligosaccharide diphtheria CRM_{197} conjugate vaccine, Novartis), bivalent rLP2086 and tetravalent non-lipidated variants and their combinations were prepared according to Tables23-26.

Table 21:Rabbits Used in This Study

Species:	Rabbit
Strain:	New Zealand white
Source:[a]	Charles River Laboratory
No. of Animals Per Group:	3
Total No. of Animals:	30
Age and Sex:	Male
Weight:	2.5-3.5 kg

[a] Rabbits were maintained in accordance with the established Institutional Animal Care and Use Committee guidelines.

The design of the study is shown in Table 22.

Table 22: Experimental Design

Group	# of Rabbit	Immunogen	Adjuvant	Vax (wk)	Serum Prep
1	3	1 Human Dosage MENVEO/dose 1.0 mL/2 sites	None	0, 4, 9	Wk 0, 4, 6, 9 Exsang: Wk 10
2	3	1:10 Human Dosage MENVEO/dose 1.0 mL/2 sites	None	0, 4, 9	Wk 0, 4, 6, 9 Exsang: Wk 10
3	3	1 Human Dosage MENVEO + 30 µg rLP2086-A (A05 (SEQ ID NO: 13)) + 30 µg rLP2086-B (B01 (SEQ ID NO: 58))/dose 1.0 mL/2 sites	$AlPO_4$ 250 µg/dose/1.0mL	0, 4, 9	Wk 0, 4, 6, 9 Exsang: Wk 10
4	3	1:10 Human Dosage MENVEO + 3 µg rLP2086-A (A05 (SEQ ID NO: 13)) + 3 µg rLP2086-B (B01 (SEQ ID NO: 58))/dose 1.0 mL/2 sites	$AlPO_4$ 250 µg/dose/1.0mL	0, 4, 9	Wk 0, 4, 6, 9 Exsang: Wk 10
5	3	30 µg rLP2086-A (A05 (SEQ ID NO: 13))+ 30 µg rLP2086-B (B01 (SEQ ID NO: 58)/dose 1.0 mL/2 sites	$AlPO_4$ 250 µg/dose/1.0mL	0, 4, 9	Wk 0, 4, 6, 9 Exsang: Wk 10
6	3	3 µg rLP2086-A (A05 (SEQ ID NO: 13))+ 3 µg rLP2086-B (B01 (SEQ ID NO: 58)/dose 1.0 mL/2 sites	$AlPO_4$ 250 µg/dose/1.0mL	0, 4, 9	Wk 0, 4, 6, 9 Exsang: Wk 10

7	3	Non-Lipidated rP2086-A05 (SEQ ID NO: 55), B09 (SEQ ID NO: 49), B22 (SEQ ID NO: 75), and B44 (SEQ ID NO: 44), 30 µg each/dose 1.0 mL/2 sites	$AlPO_4$ 250 µg/dose/1.0mL	0, 4, 9	Wk 0, 4, 6, 9 Exsang: Wk 10
8	3	Non-Lipidated rP2086-A05, B09, B22, and B44, 3 µg each/dose 1.0 mL/2 sites	$AlPO_4$ 250 µg/dose/1.0mL	0, 4, 9	Wk 0, 4, 6, 9 Exsang: Wk 10
9	3	1 Human Dosage MENVEO + Non-Lipidated rP2086-A05, B09, B22, and B44, 30 µg each/dose 1.0 mL/2 sites	$AlPO_4$ 250 µg/dose/1.0mL	0, 4, 9	Wk 0, 4, 6, 9 Exsang: Wk 10
10	3	1:10 Human Dosage of MENVEO + Non-Lipidated rP2086-A05, B09, B22, and B44, 3 µg each/dose 1.0 mL/2 sites	$AlPO_4$ 250 µg/dose/1.0mL	0, 4, 9	Wk 0, 4, 6, 9 Exsang: Wk 10

Summary of Formulations

Table 23: Formulations for Immunization

Material	Function	Formulation	Presentation/ Appearance	Amount Provided for 3 doses
MENVEO® meningococcal (Groups A, C, Y and W-135) oligosaccharide diphtheria CRM_{197} conjugate vaccine, Novartis	Active	Novartis product contains Meningococccal groups A, C, Y and W-135	Lyo A: White, fluffy cake Liquid C, Y, W-135: Clear, colorless solution	3 x 15 doses
rLP2086-A (A05 (SEQ ID NO: 13)), rLP2086-B (B01 (SEQ ID NO: 58))	Active	rLP2086 subfamily A and B at 120 µg/mL per protein in Histidine pH 6.0, appox 0.005% PS80 with 0.5 mg/mL Al of $AlPO_4$	White to off white homogeneous cloudy suspension	3 x 15 syringes (0.57mL fill volume)
L44857-50 MnB tetravalent non-lipidated	Active	A05 (SEQ ID NO: 55), B44 (SEQ ID NO: 44), B22 (SEQ ID NO: 75), and B09 (SEQ ID NO: 49) at 0.6 mg/mL formulated in 10 mM Histidine buffer, pH 6.5 with 0.01% PS80, 4.5% Trehalose, and WFI	Lyophilized; white fluffy cake	3 x 15 vials (0.7mL recon volume)
$AlPO_4$	Adjuvant	$AlPO_4$, 60 mM NaCl, WFI	White to off white homogeneous cloudy suspension	30 mL 0.5 mg/mL in 3 glass vials 30 mL 0.25 mg/mL in 3 glass vials

60 mM Saline	Diluent	NA	Clear, colorless solution	3 x 20 vials (1.0 mL fill volume)

Table 24: Excipients and Container/Closure Information			
Formulation	**Lot #**	**Source**	**Excipients**
MENVEO®	MenCYW-135 Liquid Conjugate Component (091101) MenA Lyophilized Conjugate Component (029011)	Novartis	The vaccine contains no preservative or adjuvant. Each dose of vaccine contains 10 µg MenA oligosaccharide, 5 µg of each of MenC, MenY and MenW135 oligosaccharides and 32.7 to 64.1 µg CRM_{197} protein. Residual formaldehyde per dose is estimated to be not more than 0.30 µg. (Unknown previously).
rLP2086-A (A05 (SEQ ID NO: 13)), rLP2086-B (B01 (SEQ ID NO: 58))	962-UPD-09-007 v1.0	CSMD, Pfizer Pearl River, NY	Histidine pH 6.0, appox 0.005% PS80, 0.5 mg/mL Al of $AlPO_4$
MnB non-lipidated tetravalent L44857-50	rPA05 (SEQ ID NO: 55) (L35408-140), rPB44(SEQ ID NO: 44) (L37024-36A), rPB22 (SEQ ID NO: 75) (L37024-61), rPB09 (SEQ ID NO: 49)(L43930-80)	Formulation Development, Pearl River, NY	Histidine buffer, pH 6.5 (L44130-129), Polysorbate 80 (L44130-127), Trehalose (L44863-68), WFI (B|Braun J0A012)
$AlPO_4$	0.5 mg/mL: L44863-86A 0.25 mg/mL: L44863-86B	Pfizer Pearl River, NY	$AlPO_4$ bulk H000000606-D86864M 0.9% saline (B/Broun J0A017), WFI (B/Broun J0A012)
60 mM Saline	962-UPD-10-004	CSMD, Pfizer Pearl River, NY	N/A

Contain/Closure for MnB Tetravalent:

Vials: 2 mL type-1 glass, West Pharmaceuticals

Stoppers: 13 mm vial stoppers for lyophilization, gray butyl, coated with Flurotec (WPS V2-F451W 4432/50 Gray B2-TR Westar® RU Verisure Ready-Pack), West Pharmaceuticals

Contain/Closure for 60 mM Saline:

Vials: 2mL type-1 glass, Schott (Vendor Part #: 8M002PD-CS)

Stoppers: 13 mm Daikyo D777-1, S2-F451, B2-40 Westar RS West, (Vendor Part #: 19560180)

Container/Closure for $AlPO_4$ Solutions:

Vials: Sterile Empty Vials, Size 30 mL-20 mm, Stoppers included, Allergy Laboratories, Lot # SEV070708A

TABLE 25. DATA ANALYSIS

Table 25: Analytical Tests of MnB non-lipidated Tetra-Antigen Lot L44857-50					
Test	**Target B22, B09, A05, B44 (µg/mL)**	**B22 Concentration (µg/mL)**	**B09 Concentration (µg/mL)**	**A05 Concentration (µg/mL)**	**B44 Concentration (µg/mL)**
IEX-HPLC	60/60/60/60	59.7	61.9	64.1	63.0
pH	6.5	6.52			
Appearance	Clear, colorless solution	Lyo: White, fluffy cake. Reconstitution (w/ 60mM NaCl): Clear, colorless solution			
Moisture	< 3%	0.60 %			
Lyophilized formulation was reconstitituted with Mobile Phase A during quantitation of B22, B09, A05, and B44 by IEX-HPLC; and with 60 mM NaCl diluent for pH and appearance. Karl-Fischer (ICH) method was used to measure moisture (using methanol to reconstitute lyophilized formulations).					

Table 26: pH and Appearance of $AlPO_4$ Solutions			
Sample	**Lot #**	**pH**	**Appearance**
$AlPO_4$ @ 0.5 mg/mL	L44863-86A	5.95	Cloudy, white to off white suspension
$AlPO_4$ @ 0.25 mg/mL	L44863-86B	5.91	Cloudy, white to off white suspension

The non-lipidated tetravalent protein (B22, B09, A05 and B44) were monitored for stability for 6 hours at 2-8 ^{0}C upon combination with MENVEO®.

Example 21: Serum Bactericidal Assay (SBA)

A microcolony-based serum bactericidal assay (SBA) against multiple serogroup B, C and Y meningococcal strains (Table 27) was performed on individual serum samples. Human sera from donors were qualified as the complement source for the strain tested in the assay. Complement-mediated antibody-dependent bactericidal titers were interpolated and expressed as the reciprocal of the dilution of the test serum that killed 50% of the meningococcal cells in the assay. The limit of detection of the assay was an SBA titer of 4. An SBA titer of <4 was assigned number of 2. A ≥ 4-fold rise of SBA titers in the week 10 sera in comparison to the titers in the pre-bleed was calculated and compared.

Table 27 SBA Strains

Serogroup	fHBP Variant	Strain name
B	A05	PMB1745
B	B02	PMB17
B	B09	PMB1489
B	B16	PMB2882
B	B44	PMB147
C	A68	PMB2432
C	B24	PMB2240
Y	A121	PMB3386
Y	B09	PMB3210

Example 22: Immunogenicity of the combination of lipidated or non-lipidated factor H binding proteins and the conjugated vaccine in New Zealand white rabbits

Serum bactericidal antibody is the immunologic surrogate of protection against meningococcal disease. Whether immunization with lipidated, non-lipidated rfHBP, tetravalent conjugate vaccines alone or in combination elicited bactericidal antibodies in rabbits was determined by SBA. SBA measures the level of antibodies in a serum sample by mimicking the complement-mediated bacterial lysis that occurs naturally. In humans a SBA titer of 1:4 is considered the protective; a four fold rise in titer, pre vs post immunization also considered to be an immunologically relavant immune response. Rabbit serum samples collected from weeks 0 and 10 were analyzed by SBA against strains of several meningococcal serogroups. As shown in Table 28 (higher dose) and 29 (lower dose), one week after the third immunization (week 10), the tetravalent conjugate vaccines only elicited SBA responses against MnC and MnY strains tested. All other serum samples displayed bactericidal activity against the homologous strains as well as other test strains from the same fHBP subfamily as in the vaccine formulations. It is noted that immunization with lipidated A05/B01 (SEQ ID NOs: 13 and 58, respectively) alone at 30 mcg dose each elicited the highest bactericidal antibodies against the homologous strains as well as against other tested strains from both fHBP subfamilies (Table 28). Similarly, immunization with non-lipidated A05/B09/B22/B44 (SEQ ID NOs: 55, 49, 75, and 44, respectively) alone also elicited bactericidal antibodies against strains of several meningococcal serogroups, even though the SBA titers were 3 to 15-folder lower than the lipidated bivalent vaccine (Table 30). A 100% responder rate (≥ 4-folder rise in an SBA titer) was achieved against all strains of various sergroups for lipidated fHBP, high dose of non-lipidated fHBP and all the combinations.

Table 28 Fold rise increase in SBA titers against meningococcus serogroup B, C and Y strains using sera from rabbits immunized with a higher dose combination of fHBPs and conjugate vaccine

		Fold Rise in PD3 SBA Titers								
		MnB strains					MnC strains		MnY strains	
VACCINE	Dose	A05	B02	B09	B16	B44	A68	B24	A121	B09
MENVEO	1 hu dose	1	2	1	1	1	244	53	708	226
MENVEO/ lipidated A05/B01	1 hu dose, proteins: 30 mcg each	349	871	279	806	2048	1592	401	1037	894
Lipidated A05/B01	30 mcg each	591	624	745	842	1955	1926	344	595	905
Non-lipidated A05/B09/B22/B44	30 mcg each	39	105	192	300	391	61	137	52	148
MENVEO/non-lipidated A05/B09/B22/B44	1 hu dose, proteins: 30 mcg each	34	98	108	113	178	219	125	299	135

Rabbits pre-bleed sera showed no pre-existing bactericidal activity against the tested strains. NZW rabbits (n=3) were vaccinated at weeks 0, 4 and 8 with 0.5 mL vaccine, im; data Wk10

Table 29 Fold rise increase in SBA titers against meningococcus serogroup B, C and Y strains using sera from rabbits immunized with a lower dose combination of fHBPs and conjugate vaccine

		Fold Rise in PD3 SBA Titers								
		MnB strains					MnC strains		MnY strains	
VACCINE	Dose	A05	B02	B09	B16	B44	A68	B24	A121	B09
MENVEO	1:10 hu dose	1	1	2	1	1	49	24	81	143
MENVEO/ lipidated A05/B01	1:10 hu dose, proteins: 3 mcg each	191	140	124	336	926	940	172	560	366
Lipidated A05/B01	3 mcg each	142	164	440	246	834	476	162	515	294
Non-lipidated A05/B09/B22/B44	3 mcg each	6	22	29	22	40	34	39	16	25
MENVEO/non-lipidated A05/B09/B22/B44	1:10 hu dose, proteins: 3 mcg each	10	52	76	60	158	102	100	122	

Rabbits pre-bleed sera showed no pre-existing bactericidal activity against the tested strains. NZW rabbits (n=3) were vaccinated at weeks 0, 4 and 8 with 0.5 mL vaccine, im; data Wk10

Table 30 SBA responder rates against meningococcus serogroup B, C and Y strains using sera from rabbits immunized with a combination of fHBPs and conjugate vaccine

		PD3 Responders (≥4 fold rise)								
		MnB strains					MnC strains		MnY strains	
VACCINE	Dose	A05	B02	B09	B16	B44	A68	B24	A121	B09
MENVEO	1 hu dose	0	0	0	0	0	100	100	100	100
MENVEO	1:10 hu dose	0	0	0	0	0	100	100	100	100
MENVEO/ lipidated A05/B01	1 hu dose, proteins: 30 µg each	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MENVEO/ lipidated A05/B01	1:10 hu dose, proteins: 3 µg each	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Lipidated A05/B01	30 µg each	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Lipidated A05/B01	3 µg each	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Non-lipidated A05/B09/B22/B44	30 µg each	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Non-lipidated A05/B09/B22/B44	3 µg each	67	67	67	67	100	67	100	67	100
MENVEO/non-lipidated A05/B09/B22/B44	1 hu dose, proteins: 30 µg each	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MENVEO/non-lipidated A05/B09/B22/B44	1:10 hu dose, proteins: 3 µg each	67	100	100	100	100	100	100	100	100

NZQ rabbits (n=3) were vaccinated at weeks 0, 4 and 8 with 0.5 mL vaccine, im; data Wk10

Lipidated fHBP elicited higher SBA titers than the non-lipidated fHBP.

The lipidated fHBP at 30 mcg each per dose elicited 3-15-folder higher SBA titers to all the meningococcal B, C and Y strains tested. The non-lipidated fHBP at 30 mcg each per dose elicited 4-23-folder higher SBA titers to all the meningococcal B, C and Y strains tested (Tables 28-29).

Dose titration was achieved with the fHBPs, the conjugate vaccine or the combinations

With a higher dose of conjugate vaccine, fHBPs or their combinations increased the SBA responses than with a lower dose (Tables 28-30). The one human dose of the conjugate vaccine elicited 2-8-folder high SBA titers against meningococcal C and Y strains than the one tenth dose of the conjugate vaccine. The lipidated fHBP at 30 mcg each per dose elicited 2-4 folder high SBA titers against all the strains tested than the 3 mcg each per dose. The non-lipidated fHBP at 30 mcg each per dose elicited 4-15-folder high SBA titers against all the meningococcal serogroups B, C and Y strains than the 3 mcg each per dose.

Synergistic SBA responses by combination of fHBP and conjugate vaccines

There is a trend that the SBA responses are higher against meningococcal serogroups C and Y strains when the combination of conjugate vaccine and fHBP was used than by using either component alone, especially with the addition of a lower dose of lipidated or non-lipidated fHBP (Table 29). In the present study, the functional activity was evaluated against strains of several meningococcal serogroups using sera from New Zealand white rabbits immunized with recombinant lipidated or non-lipidated fHBP in formulation with $AlPO_4$ and the conjugate vaccine alone or in combination. Rabbits receiving the conjugate vaccine elicited SBA responses only against meningococcal serogroup C and Y strains, but not to the serogroup B strains. The lipidated or non-lipidated fHBP in formulation with $AlPO_4$ elicited serum antibodies which were bactericidal against strains of all the meningococcal serogroups tested.

New Zealand white rabbits receiving three doses of the lipidated or non-lipidated fHBP in formulation with $AlPO_4$ elicited serum antibodies which were bactericidal against meningococcal serogroups B, C and Y strains tested. A 100% of responder rate (≥4-folder rise in an SBA titer) was achieved against all the strains tested except the lower dose non-lipidated group.

The lipidated fHBP elicited greater bactericidal antibody titers than the non-lipidated forms. A clear dose response was observed with the lipidated or non-lipidated fHBP and the conjugate vaccine alone or in combinations.

There is a trend of synergistic SBA responses against meningococcal serogroup C and Y strains between the conjugate vaccine and fHBP especially at the addition of lower dose proteins.

Example 23: Evaluation of the immunogenicity of combinations of non-lipidated factor H binding proteins in New Zealand White Rabbits

Studies were carried out in New Zealand White rabbits in the 2.5-3.5 kg range obtained from Charles River, Canada (Table 31). Rabbits were vaccinated intramuscularly at the hind leg, 0.5mL per site (1.0mL per dose, see Table 32) at weeks 0, 4 and 9. The Sequence ID Numbers for each of the antigens tested are listed in Table 33. There were 10 rabbits per group. Rabbits were bled at weeks 0, 6 and exsanguinated at week 10. Serum samples were prepared and week 0 and 10 serum samples were analyzed in the SBA against a panel of *N. meningitidis* isolates.

Table 31: Rabbits Used in these Studies[a]

Species	Rabbit
Strain	New Zealand White
Source	Charles River Laboratory
Number Animals per group	10
Sex	Female
Weight	2.5-3.5 kg

[a] Rabbits were maintained in accordance with established Institutional Animal Care and Use Committee guidelines

Table 32: Study Design[a]

# of rabbits	Antigenic composition fHBP Variants	Lipidated	Dose	$AlPO_4$ (0.25mg/dose)
10	A62 + B44	No	10mcg each	Yes
10	A05 + A62 + B44	No	10mcg each	Yes
10	A05 + A62 + B09 + B44	No	10mcg each	Yes
10	A05 + A62 +B09 + B44	No	5mcg each	Yes
10	A05 + A12 +B09 + B44	No	5mcg each	Yes
10	A12 + A62 + B09 + B44	No	5mcg each	Yes
10	A05 + A12 + A62 + B09 + B44	No	5mcg each	Yes
10	A05 + B01	Yes	10mcg each	Yes

[a] Rabbits were vaccinated intramuscularly (weeks 0, 4 and 9) and bled (weeks 0, 6 and 10) to prepare serum samples for SBA analysis

Table 33: *N. meningitidis* Serogroup B fHBP Protein Variants Used

rP2086-A05	SEQ ID NO: 13, wherein the Cys at position 1 is deleted, or SEQ ID NO: 55, e.g., encoded by SEQ ID NO: 54
rP2086-A12	SEQ ID NO: 14, wherein the Cys at position 1 is deleted, or SEQ ID NO: 66, e.g., encoded by SEQ ID NO: 67
rP2086-A62	SEQ ID NO: 70, wherein the Cys at position 1 is deleted, or SEQ ID NO: 71, e.g., encoded by SEQ ID NO: 72
rP2086-B09	SEQ ID NO: 18, wherein the Cys at position 1 is deleted, or SEQ ID NO: 49
rP2086-B44	SEQ ID NO: 21, wherein the Cys at position 1 is deleted, or SEQ ID NO: 44, e.g., encoded by SEQ ID NO: 43
rLP2086-A05	SEQ ID NO: 76
rLP2086-B01	SEQ ID NO: 58

Table 34 summarizes the immune response in rabbits to mixtures of non-lipidated fHBP proteins compared to the immune response to the rLP2086-A05 and rLP2086-B01 pair of lipidated antigens. Rabbit pre-bleed sera generally showed no pre-existing bactericidal activity against the tested strains. The immune response is presented as the percent of animals in each treatment group that respond to the respective combinations of fHBP antigens following the third immunization with an increase in SBA titer of ≥4 fold. The SBA assay was performed using target *N. meningitidis* strains that either express fHBP variants identical to the vaccine immunogen (A05, A12), or strains that express heterologous fHBP variants (A22, B16, B24). The comparative amino acid sequence identity of the A22 fHBP variant diverges up to 15% from the subfamily A variants tested. Similarly, the comparative amino acid sequence identity of the B16 and B24 fHBP variants diverges up to 12% from the subfamily B variants included as antigens.

Table 34: Percent of New Zealand White Rabbits Vaccinated with Recombinant Non-lipidated fHBPs that Respond With a ≥4 Fold Rise in SBA Titers Post-Dose Three

			% Responders at PD3 with ≥ 4X rise SBA Titers				
Immunogen[a]	Lipidated	Dose per antigen (mcg/0.5 mL)	A05	A12	A22	B16	B24
A62 + B44	No	10	nd	50	100	100	50
A05 + A62 + B44	No	10	nd	40	80	80	60
A05 + A62 + B09 + B44	No	10	nd	60	100	100	100
A05 + A62 + B09 + B44	No	5	nd	40	40	100	70
A05 + A12 + B09 + B44	No	5	60	40	60	60	60
A12 + A62 + B09 + B44	No	5	100	70	100	100	70
A05 + A12 + A62 + B09 + B44	No	5	100	100	100	100	60
A05 + B01	Yes	10	nd	80	90	100	90

[a] 10 animals per treatment group; all treatments formulated with $AlPO_4$ adjuvant (250mcg/dose)

In those groups of rabbits immunized with 10mcg of each test rP2086 variant, serum samples from animals treated with the combination of A05 + A62 + B09 + B44 had the highest bactericidal response rate. The SBA response was somewhat reduced in animals treated with only 5mcg each of the same mixture of four non-lipidated fHBP variants. Other 4-valent groups of fHBP antigens dosed at 5mcg did as well as the combination of non-lipidated A05 + A62 + B09 + B44. Of the 4-valent combinations tested, serum samples from the treatment group that included 5mcg each of non-

lipidated fHBP variants A12 + A62 + B09 + B44 had the best SBA response rates for the selected assay strains. The response rate to the pentavalent non-lipidated combination of A05 + A12 + A62 + B09 + B44 is somewhat better than the response to any of the 4-valent combinations tested.

What is claimed is:

1. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence that is at least 95% identical to SEQ ID NO: 71, wherein the first twenty amino acid residues of the sequence does not comprise a cysteine.

2. The isolated polypeptide according to claim 1, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence at position 1-184 of SEQ ID NO: 71.

3. The isolated polypeptide according to claim 1, wherein the polypeptide comprises at least 6 contiguous amino acids from the amino acid sequence at position 185-254 of SEQ ID NO: 71.

4. The isolated polypeptide according to claim 1, wherein the polypeptide is non-pyruvylated.

5. The isolated polypeptide according to claim 1, wherein the polypeptide is non-lipidated.

6. The isolated polypeptide according to claim 1, wherein the polypeptide is immunogenic.

7. The isolated polypeptide according to claim 1, wherein the amino acid sequence consists of the sequence set forth in SEQ ID NO: 71.

8. An immunogenic composition comprising the polypeptide as in any of claims 1-7.

9. The immunogenic composition according to claim 8, further comprising an A12 polypeptide.

10. The immunogenic composition according to claim 8, further comprising an A05 polypeptide.

11. The immunogenic composition according to claim 8, further comprising an B09 polypeptide.

12. The immunogenic composition according to claim 8, further comprising an B44 polypeptide.

13. The immunogenic composition according to claim 8, further comprising an A12, B09, and B44 polypeptide.

14. The immunogenic composition according to claim 8, further comprising an A05, A12, B09, and B44 polypeptide.

15. The immunogenic composition as in any of claims 9-14, wherein each polypeptide is non-lipidated.

16. The immunogenic composition as in any of claims 9-14, wherein each polypeptide is non-pyruvylated.

17. An isolated nucleic acid sequence encoding an isolated polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 71.

18. The isolated nucleic acid sequence according to claim 17, wherein the nucleic acid sequence comprises SEQ ID NO: 72.

19. An immunogenic composition comprising an isolated non-lipidated, non-pyruvylated ORF2086 polypeptide from *Neisseria meningitidis* serogroup B, and at least one conjugate selected from:

a) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A

b) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C

c) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup W135; and

d) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup Y.

20. The immunogenic composition according to claim 19, wherein the composition comprises at least two conjugates selected from:

a) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A

b) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C

c) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup W135; and

a) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup Y.

21. The immunogenic composition according to claim 19, wherein the composition comprises at least three conjugates selected from:

a) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A

b) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C

c) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup W135; and

d) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup Y.

22. The immunogenic composition according to claim 19, wherein the composition comprises a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A; a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C; a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup W135; and a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup Y.

23. The immunogenic composition according to claim 19, wherein the polypeptide is a subfamily A polypeptide.

24. The immunogenic composition according to claim 19, wherein the polypeptide is a subfamily B polypeptide.

25. The immunogenic composition according to claim 19, wherein the polypeptide is a non-pyruvylated non-lipidated A05.

26. The immunogenic composition according to claim 19, wherein the polypeptide is a non-pyruvylated non-lipidated A12.

27. The immunogenic composition according to claim 19, wherein the polypeptide is a non-pyruvylated non-lipidated A22.

28. The immunogenic composition according to claim 19, wherein the polypeptide is a non-pyruvylated non-lipidated B01.

29. The immunogenic composition according to claim 19, wherein the polypeptide is a non-pyruvylated non-lipidated B03.

30. The immunogenic composition according to claim 19, wherein the polypeptide is a non-pyruvylated non-lipidated B09.

31. The immunogenic composition according to claim 19, wherein the polypeptide is a non-pyruvylated non-lipidated B15.

32. The immunogenic composition according to claim 19, wherein the polypeptide is a non-pyruvylated non-lipidated B16.

33. The immunogenic composition according to claim 19, wherein the polypeptide is a non-pyruvylated non-lipidated B22.

34. The immunogenic composition according to claim 19, wherein the polypeptide is a non-pyruvylated non-lipidated B24.

35. The immunogenic composition according to claim 19, wherein the polypeptide is a non-pyruvylated non-lipidated B44.

36. The immunogenic composition according to claim 19, wherein the polypeptide is a non-pyruvylated non-lipidated A62.

37. The immunogenic composition according to claim 19, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, and SEQ ID NO: 75.

38. A method of inducing an immune response against *Neisseria meningitidis* in a mammal, comprising administering to the mammal an effective amount of an immunogenic composition comprising an isolated non-lipidated, non-pyruvylated ORF2086 polypeptide from *Neisseria meningitidis* serogroup B, and at least one conjugate selected from:

a) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A,

b) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C,

c) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup W135, and

d) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup Y.

39. A method of eliciting a bactericidal antibody against *Neisseria meningitidis* serogroup C in a mammal, comprising administering to the mammal an effective amount of an immunogenic composition comprising an isolated non-lipidated, non-pyruvylated ORF2086 polypeptide from *Neisseria meningitidis* serogroup B.

40. The method according to claim 39, wherein the polypeptide consists of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 71 or the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, and SEQ ID NO: 21, wherein the cysteine at position 1 is deleted.

41. The method according to claim 39, wherein the immunogenic composition further comprises at least one conjugate selected from:

a) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A,

b) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C,

c) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup W135, and

d) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup Y.

42. A method of eliciting a bactericidal antibody against *Neisseria meningitidis* serogroup Y in a mammal, comprising administering to the mammal an effective amount of an immunogenic composition comprising an an isolated non-lipidated, non-pyruvylated ORF2086 polypeptide from *Neisseria meningitidis* serogroup B.

43. The method according to claim 42, wherein the polypeptide consists of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 71 or the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, and SEQ ID NO: 21, wherein the cysteine at position 1 is deleted.

44. The method according to claim 42, wherein the immunogenic composition further comprises at least one conjugate selected from:

a) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A,

b) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C,

c) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup W135, and

d) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup Y.

45. A method of eliciting a bactericidal antibody against *Neisseria meningitidis* in a mammal, comprising administering to the mammal an effective amount of an immunogenic composition comprising an isolated non-lipidated, non-pyruvylated ORF2086 polypeptide from *Neisseria meningitidis* serogroup B, and at least one conjugate selected from:

a) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A,

b) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C,

c) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup W135, and

d) a conjugate of a capsular saccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup Y.

46. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence that is at least 95% identical to SEQ ID NO: 71.

47. The polypeptide according to claim 46, wherein the sequence comprises SEQ ID NO: 71.

48. The polypeptide according to claim 46, wherein the polypeptide is non-lipidated.

49. The polypeptide according to claim 46, wherein the polypeptide is non-pyruvylated.

50. The polypeptide according to claim 46, wherein the polypeptide is non-lipidated and non-pyruvylated.

51. The polypeptide according to claim 46, wherein the polypeptide is immunogenic.

FIG. 1A

P2086 Non-lipidated Variant Nucleic Acid Sequences

>A04 Variant Nucleic Acid Sequence (SEQ ID NO: 1)
TGCAGCAGCGGAGGCGGAGGCGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGCACGGGGCTTGCCGATGCACTAACTGCGCCGCTCGACC
ATAAAGACAAAGGTTTGAAATCCCTGACATTGGAAGACTCCATTCCCCAAAACGGAACACTGACCCTGTCGGCACAAGGTGC
GGAAAAAACTTTCAAAGCCGGCGACAAAGACAACAGCCTCAACACGGGCAAACTGAAGAACGACAAAATCAGCCGCTTCGAC
TTCGTGCAAAAAATCGAAGTGGACGGACAAACCATCACACTGGCAAGCGGCGAATTTCAAATATACAAACAGGACCACTCCG
CCGTCGTTGCCCTACAGATTGAAAAAATCAACAACCCCGACAAAATCGACAGCCTGATAAACCAACGCTCCTTCCTTGTCAG
CGGTTTGGGCGGAGAACATACCGCCTTCAACCAACTGCCCGGCGACAAAGCCGAGTATCACGGCAAAGCATTCAGCTCCGAC
GATGCCGGCGGAAAACTGACCTATACCATAGATTTTGCCGCCAAACAGGGACACGGCAAAATCGAACACCTGAAAACACCCG
AGCAAAATGTCGAGCTTGCCGCCGCCGAACTCAAAGCAGATGAAAAATCACACGCCGTCATTTTGGGCGACACGCGCTACGG
CAGCGAAGAAAAAGGCACTTACCACCTCGCCCTTTTCGGCGACCGCGCCCAAGAAATCGCCGGCTCGGCAACCGTGAAGATA
GGGGAAAAGGTTCACGAAATCGGCATCGCCGGCAAACAGTAG

>A05 Variant Nucleic Acid Sequence (SEQ ID NO: 2)
TGCAGCAGCGGAAGCGGAAGCGGAGGCGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGCACAGGGCTTGCCGATGCACTAACTGCGCCGC
TCGACCATAAAGACAAAGGTTTGAAATCCCTGACATTGGAAGACTCCATTTCCCAAAACGGAACACTGACCCTGTCGGCACA
AGGTGCGGAAAAAACTTTCAAAGTCGGCGACAAAGACAACAGTCTCAATACAGGCAAATTGAAGAACGACAAAATCAGCCGC
TTCGACTTTGTGCAAAAAATCGAAGTGGACGGACAAACCATCACGCTGGCAAGCGGCGAATTTCAAATATACAAACAGGACC
ACTCCGCCGTCGTTGCCCTACAGATTGAAAAAATCAACAACCCCGACAAAATCGACAGCCTGATAAACCAACGCTCCTTCCT
TGTCAGCGGTTTGGGCGGAGAACATACCGCCTTCAACCAACTGCCCAGCGGCAAAGCCGAGTATCACGGCAAAGCATTCAGC
TCCGACGATGCCGGCGGAAAACTGACCTATACCATAGATTTTGCCGCCAAACAGGGACACGGCAAAATCGAACACCTGAAAA
CACCCGAGCAGAATGTCGAGCTTGCCTCCGCCGAACTCAAAGCAGATGAAAAATCACACGCCGTCATTTTGGGCGACACGCG
CTACGGCAGCGAAGAAAAAGGCACTTACCACCTCGCTCTTTTCGGCGACCGAGCCCAAGAAATCGCCGGCTCGGCAACCGTG
AAGATAAGGGAAAAGGTTCACGAAATCGGCATCGCCGGCAAACAGTAG

FIG. 1B

>A12 Variant Nucleic Acid Sequence (SEQ ID NO: 3)

TGCAGCAGCGGAGGCGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGCGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCGCTCGACCATAAAG
ACAAAAGTTTGCAGTCTTTGACGCTGGATCAGTCCGTCAGGAAAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA
AACTTATGGAAACGGCGACAGCCTCAATACGGGCAAATTGAAGAACGACAAGGTCAGCCGCTTCGACTTTATCCGTCAAATC
GAAGTGGACGGACAAACCATCACGCTGGCAAGCGGCGAATTTCAAATATACAAACAGAACCACTCCGCCGTCGTTGCCCTAC
AGATTGAAAAAATCAACAACCCCGACAAAATCGACAGCCTGATAAACCAACGCTCCTTCCTTGTCAGCGGTTTGGGCGGAGA
ACATACCGCCTTCAACCAACTGCCTGACGGCAAAGCCGAGTATCACGGCAAAGCATTCAGCTCCGACGACCCGAACGGCAGG
CTGCACTACTCCATTGATTTTACCAAAAAACAGGGTTACGGCAGAATCGAACACCTGAAAACGCCCGAGCAGAATGTCGAGC
TTGCCTCCGCCGAACTCAAAGCAGATGAAAAATCACACGCCGTCATTTTGGGCGACACGCGCTACGGCGGCGAAGAAAAAGG
CACTTACCACCTCGCCCTTTTCGGCGACCGCGCCCAAGAAATCGCCGGCTCGGCAACCGTGAAGATAAGGGAAAAGGTTCAC
GAAATCGGCATCGCCGGCAAACAGTAG

>A12-2 Variant Nucleic Acid Sequence (SEQ ID NO: 4)

TGCAGCAGCGGAGGGGGCGGTGTCGCCGCCGACATTGGTGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCGCTCGACCATAAAG
ACAAAAGTTTGCAGTCTTTGACGCTGGATCAGTCCGTCAGGAAAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA
AACTTATGGAAACGGCGACAGCCTCAATACGGGCAAATTGAAGAACGACAAGGTCAGCCGCTTCGACTTTATCCGTCAAATC
GAAGTGGACGGACAAACCATCACGCTGGCAAGCGGCGAATTTCAAATATACAAACAGAACCACTCCGCCGTCGTTGCCCTAC
AGATTGAAAAAATCAACAACCCCGACAAAATCGACAGCCTGATAAACCAACGCTCCTTCCTTGTCAGCGGTTTGGGCGGAGA
ACATACCGCCTTCAACCAACTGCCTGACGGCAAAGCCGAGTATCACGGCAAAGCATTCAGCTCCGACGACCCGAACGGCAGG
CTGCACTACTCCATTGATTTTACCAAAAAACAGGGTTACGGCAGAATCGAACACCTGAAAACGCCCGAGCAGAATGTCGAGC
TTGCCTCCGCCGAACTCAAAGCAGATGAAAAATCACACGCCGTCATTTTGGGCGACACGCGCTACGGCGGCGAAGAAAAAGG
CACTTACCACCTCGCCCTTTTCGGCGACCGCGCCCAAGAAATCGCCGGCTCGGCAACCGTGAAGATAAGGGAAAAGGTTCAC
GAAATCGGCATCGCCGGCAAACAGTAG

FIG. 1C

>A22 Variant Nucleic Acid Sequence (SEQ ID NO: 5)
TGCAGCAGCGGAGGCGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGCGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCGCTCGACCATAAAG
ACAAAAGTTTGCAGTCTTTGACGCTGGATCAGTCCGTCAGGAAAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA
AACTTATGGAAACGGCGACAGCCTCAATACGGGCAAATTGAAGAACGACAAGGTCAGCCGCTTCGACTTTATCCGTCAAATC
GAAGTGGACGGGCAGCTCATTACCTTGGAGAGCGGAGAGTTCCAAATATACAAACAGGACCACTCCGCCGTCGTTGCCCTAC
AGATTGAAAAAATCAACAACCCCGACACAAAATCGACAGCCTGATAAACCAACGCTCCTTCCTTGTCAGCGGTTTGGGTGGAGA
ACATACCGCCTTCAACCAACTGCCCAGCGGCAAAGCCGAGTATCACGGCAAAGCATTCAGCTCCGACGATGCTGGCGGAAAAA
CTGACCTATACCATAGATTTCGCCGCCAACACAGGGACACGGCAAAATCGAACACTTGAAAACACACCCGAGCAAAATGTCGAGC
TTGCCTCCGCCGAACTCAAAGCAGATGAAAAATCACACACGCCGTCATTTTGGGCGACACGCGCTACGGCGGCGAAGAAAAAGG
CACTTACCACACCTCGCCCTTTTCGGCGACCGCGCCCAAGAAATCGCCGGCTCGGCAACCGTGAAGATAAGGGAAAAAGGTTCAC
GAAATCGGCATCGCCGGCAAACAGTAG

>B02 Variant Nucleic Acid Sequence (SEQ ID NO: 6)
TGCAGCAGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGCGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGCGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCAC
CGCTCGACCATAAAGACAAAGGTTTGAAATCCCTGACATTGGAAGACTCCATTTCCCAAAACGGAACACACTGACCCTGTCGGC
ACAAGGTGCGGAAAGAACTTTCAAAGCCGGCGACAAAGACACAACAGTCTCAACACACAGGCAAACTGAAGAACGACAAAATCAGC
CGCTTCGACTTTATCCGTCAAATCGAAGTGGACGGGCAGCTCATTACCTTGGAGAGCGGAGAGTTCCAAGTGTACAAACAAA
GCCATTCCGCCTTAACCGCCCTTCAGACCGAGCAAGTACAAGACTCGGAGCATTCCGGGAAGATGGTTGCGAAACGCCAGTT
CAGAATCGGCGACATAGTGGGCGAACATACATCTTTTGACAAGCTTCCCAAAGACGTCATGGCGACATATCGCGGGACGGCG
TTCGGTTCAGACGATGCCGGCGGAAAACTGACCTACACCATAGATTTCGCCGCCAAGGCAGGGACACGGCAAAATCGAACATT
TGAAATCGCCTGAACTCAATGTTGACCTGGCCGCCGCCGATATCAAGCCGGATGAAAAACACCATGCCGTCATCAGCGGTTC
CGTCCTTTACAACCAAGCCGAGAAAGGCAGTTACTCTCTAGGCATCTTTGGCGGGCAAGCCCAGGAAGTTGCCGGCAGCGCG
GAAGTGGAAACCGCAAACGGCATACGCCATATCGGTCTTGCCGCCAAGCAATAA

FIG. 1D

>B03 Variant Nucleic Acid Sequence (SEQ ID NO: 7)
TGCAGCAGCGGAGGCGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGCGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCGCTCGACCATAAAG
ACAAAAGTTTGCAGTCTTTGACGCTGGATCAGTCCGTCAGGAAAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA
AACTTATGGAAACGGCGACAGCCTTAATACGGGCAAATTGAAGAACGACAAGGTCAGCCGTTTCGACTTTATCCGTCAAATC
GAAGTGGACGGGCAGCTCATTACCTTGGAGAGCGGAGAGTTCCAAGTGTACAAACAAAGCCATTCCGCCTTAACCGCCCTTC
AGACCGAGCAAGAACAAGATCCAGAGCATTCCGGGAAGATGGTTGCGAAACGCCGGTTCAAAATCGGCGACATAGCGGGCGA
ACATACATCTTTTGACAAGCTTCCCAAAGACGTCATGGCGACATATCGCGGGACGGCGTTCGGTTCAGACGATGCCGGCGGA
AAACTGACCTATACTATAGATTTTGCTGCCAAACAGGGACACGGCAAAATCGAACATTTGAAATCGCCCGAACTCAATGTCG
AGCTTGCCACCGCCTATATCAAGCCGGATGAAAAACACCATGCCGTCATCAGCGGTTCCGTCCTTTACAATCAAGACGAGAA
AGGCAGTTACTCCCTCGGTATCTTTGGCGGGCAAGCCCAGGAAGTTGCCGGCAGCGCGGAAGTGGAAACCGCAAACGGCATA
CACCATATCGGTCTTGCCGCCAAGCAATAA

>B09 Variant Nucleic Acid Sequence (SEQ ID NO: 8)
TGCAGCAGCGGAGGGGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGTGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCGCTCGACCATAAAG
ACAAAGGTTTGCAGTCTTTAACGCTGGATCAGTCCGTCAGGAAAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA
AACTTATGGAAACGGCGACAGCCTTAATACGGGCAAATTGAAGAACGACAAGGTCAGCCGCTTCGACTTTATCCGTCAAATC
GAAGTGGACGGGAAGCTCATTACCTTGGAGAGCGGAGAGTTCCAAGTGTACAAACAAAGCCATTCCGCCTTAACCGCCCTTC
AGACCGAGCAAGTACAAGACTCGGAGGATTCCGGGAAGATGGTTGCGAAACGCCAGTTCAGAATCGGCGACATAGCGGGCGA
ACATACATCTTTTGACAAGCTTCCCAAAGGCGGCAGTGCGACATATCGCGGGACGGCGTTCGGTTCAGACGATGCTGGCGGA
AAACTGACCTATACTATAGATTTCGCCGCCAAGCAGGGACACGGCAAAATCGAACATTTGAAATCGCCCGAACTCAATGTCG
AGCTTGCCACCGCCTATATCAAGCCGGATGAAAAACGCCATGCCGTTATCAGCGGTTCCGTCCTTTACAACCAAGACGAGAA
AGGCAGTTACTCCCTCGGTATCTTTGGCGGGCAAGCCCAGGAAGTTGCCGGCAGCGCGGAAGTGGAAACCGCAAACGGCATA
CACCATATCGGTCTTGCCGCCAAGCAGTAA

FIG. 1E

>B22 Variant Nucleic Acid Sequence (SEQ ID NO: 9)
TGCAGCAGCGGAGGCGGCGGTGTCGCCGCCGGCGGTGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCGCTCGACCATAAAG
ACAAAAGTTTGCAGTCTTTGACGCTGGATCAGTCCGTCAGGAAAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA
AACTTATGGAAACGGCGACAGCCTCAATACGGGCAAATTGAAGAACGACAAGGTCAGCCGCTTCGACTTTATCCGTCAAATC
GAAGTGGACGGGCAGCTCATTACCTTGGAGAGCGGAGAGTTCCAAGTGTACAAACAAAGCCATTCCGCCTTAACCGCCCTTC
AGACCGAGCAAGTACAAGATTCGGAGCATTCAGGGAAGATGGTTGCGAAACGCCAGTTCAGAATCGGCGATATAGCGGGTGA
ACATACATCTTTTGACAAGCTTCCCGAAGGCGGCAGGGCGACATATCGCGGGACGGCATTCGGTTCAGACGATGCCAGTGGA
AAACTGACCTACACCATAGATTTCGCCGCCAAGCAGGGACACGGCAAAATCGAACATTTGAAATCGCCAGAACTCAATGTTG
ACCTGGCCGCCTCCGATATCAAGCCGGATAAAAAACGCCATGCCGTCATCAGCGGTTCCGTCCTTTACAACCAAGCCGAGAA
AGGCAGTTACTCTCTAGGCATCTTTGGCGGGCAAGCCCAGGAAGTTGCCGGCAGCGCAGAAGTGGAAACCGCAAACGGCATA
CGCCATATCGGTCTTGCCGCCAAGCAGTAA

>B24 Variant Nucleic Acid Sequence (SEQ ID NO: 10)
TGCAGCAGCGGAGGGGGTGGTGTCGCCGCCGACATCGGTGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCGCTCGACCATAAAG
ACAAAGGTTTGCAGTCTTTGACGCTGGATCAGTCCGTCAGGAAAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA
AACTTATGGAAACGGTGACAGCCTCAATACGGGCAAATTGAAGAACGACAAGGTCAGCCGTTTCGACTTTATCCGCCAAATC
GAAGTGGACGGGCAGCTCATTACCTTGGAGAGTGGAGAGTTCCAAGTATACAAACAAAGCCATTCCGCCTAACCGCCTTTC
AGACCGAGCAAATACAAGATTCGGAGCATTCCGGGAAGATGGTTGCGAAACGCCAGTTCAGAATCGGCGACATAGCGGGCGA
ACATACATCTTTTGACAAGCTTCCCGAAGGCGGCAGGGCGACATATCGCGGGACGGCATTCGGTTCAGACGATGCCGGCGGA
AAACTGACCTACACCATAGATTTCGCCGCCAAGCAGGGAAACGGCAAAATCGAACATTTGAAATCGCCAGAACTCAATGTCG
ACCTGGCCGCCGCCGATATCAAGCCGGATGGAAAACGCCATGCCGTCATCAGCGGTTCCGTCCTTTACAACCAAGCCGAGAA
AGGCAGTTACTCCCTCGGTATCTTTGGCGGAAAAGCCCAGGAAGTTGCCGGCAGCGCGGGAAGTGAAAACCGTAAACGGCATA
CGCCATATCGGCCTTGCCGCCAAGCAATAA

FIG. 1F

>B44 Variant Nucleic Acid Sequence (SEQ ID NO: 11)

TGCAGCAGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGCGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGCGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCAC

CGCTCGACCATAAAGACAAAGGTTTGAAATCCCTGACATTGGAAGACTCCATTTCCCAAAACGGAACACTGACCCTGTCGGC

ACAAGGTGCGGAAAGAACTTTCAAAGCCGGCGACAAAGACAACAGTCTCAACACAGGCAAACTGAAGAACGACAAAATCAGC

CGCTTCGACTTTATCCGTCAAATCGAAGTGGACGGGCAGCTCATTACCTTGGAGAGCGGAGAGTTCCAAGTGTACAAACAAA

GCCATTCCGCCTTAACCGCCCTTCAGACCGAGCAAGTACAAGACTCGGAGCATTCCGGGAAGATGGTTGCGAAACGCCAGTT

CAGAATCGGCGACATAGTGGGCGAACATACATCTTTTGGCAAGCTTCCCAAAGACGTCATGGCGACATATCGCGGGACGGCG

TTCGGTTCAGACGATGCCGGCGGAAAACTGACCTACACCATAGATTTCGCCGCCAAGGCAGGACACGGCAAAATCGAACATT

TGAAATCGCCAGAACTCAATGTTGACCTGGCCGCCGCCGATATCAAGCCGGATGAAAAACACCATGCCGTCATCAGCGGTTC

CGTCCTTTACAACCAAGCCCGAGAAAGGCAGTTACTCTCTCTAGGCATCTTTGGCGGGCAAGCCCAGGAAGTTGCCGGCAGCGCG

GAAGTGGAAACCGCAAACGGCATACGCCATATCGGTCTTGCCGCCAAGCAATAA

FIG. 2A

P2086 Non-lipidated Variant Amino Acid Sequences

>A04 Variant Amino Acid Sequence (SEQ ID NO: 12)
CSSGGGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFD
FVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGDKAEYHGKAFSSD
DAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKI
GEKVHEIGIAGKQ

>A05 Variant Amino Acid Sequence (SEQ ID NO: 13)
CSSGSGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAEKTFKVGDKDNSLNTGKLKNDKISR
FDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFS
SDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATV
KIREKVHEIGIAGKQ

>A12 Variant Amino Acid Sequence (SEQ ID NO: 14)
CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQI
EVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGR
LHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVH
EIGIAGKQ

>A22 Variant Amino Acid Sequence (SEQ ID NO: 15)
CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQI
EVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGK
LTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVH
EIGIAGKQ

FIG. 2B

>B02 Variant Amino Acid Sequence (SEQ ID NO: 16)
CSSGGGGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAERTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKIS
RFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIVGEHTSFDKLPKDVMATYRGTA
FGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSA
EVETANGIRHIGLAAKQ

>B03 Variant Amino Acid Sequence (SEQ ID NO: 17)
CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQI
EVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQEQDPEHSGKMVAKRRFKIGDIAGEHTSFDKLPKDVMATYRGTAFGSDDAGG
KLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGI
HHIGLAAKQ

>B09 Variant Amino Acid Sequence (SEQ ID NO: 18)
CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQI
EVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGG
KLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGI
HHIGLAAKQ

>B22 Variant Amino Acid Sequence (SEQ ID NO: 19)
CSSGGGGVAADIGAVLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQI
EVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDASG
KLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAASDIKPDKKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGI
RHIGLAAKQ

FIG. 2C

>B24 Variant Amino Acid Sequence (SEQ ID NO: 20)
CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQI
EVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGG
KLTYTIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGI
RHIGLAAKQ

>B44 Variant Amino Acid Sequence (SEQ ID NO: 21)
CSSGGGGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAERTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKIS
RFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMATYRGTA
FGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSA
EVETANGIRHIGLAAKQ

FIG. 3

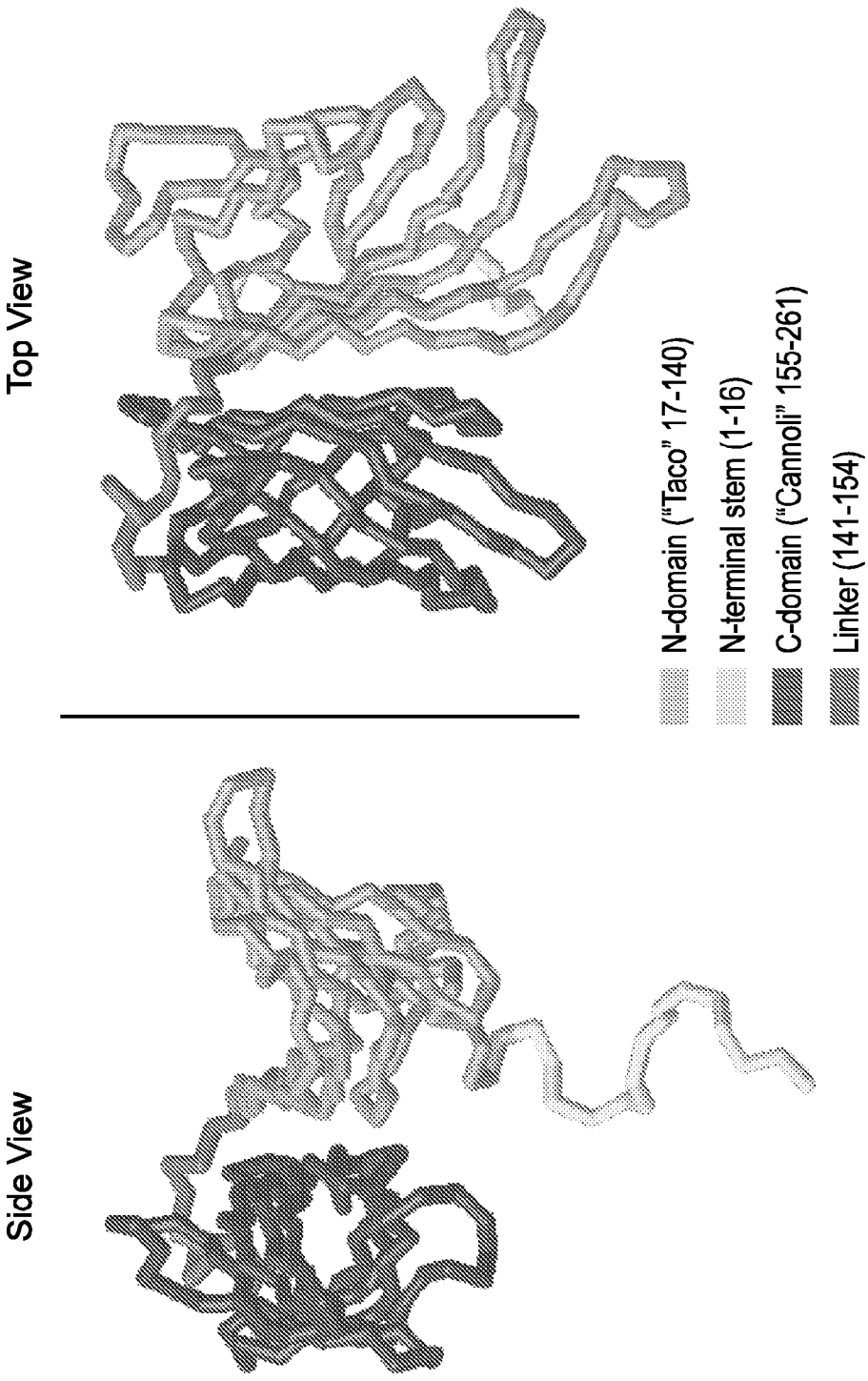

Top View
Side View
N-domain ("Taco" 17-140)
N-terminal stem (1-16)
C-domain ("Cannoli" 155-261)
Linker (141-154)

FIG. 4

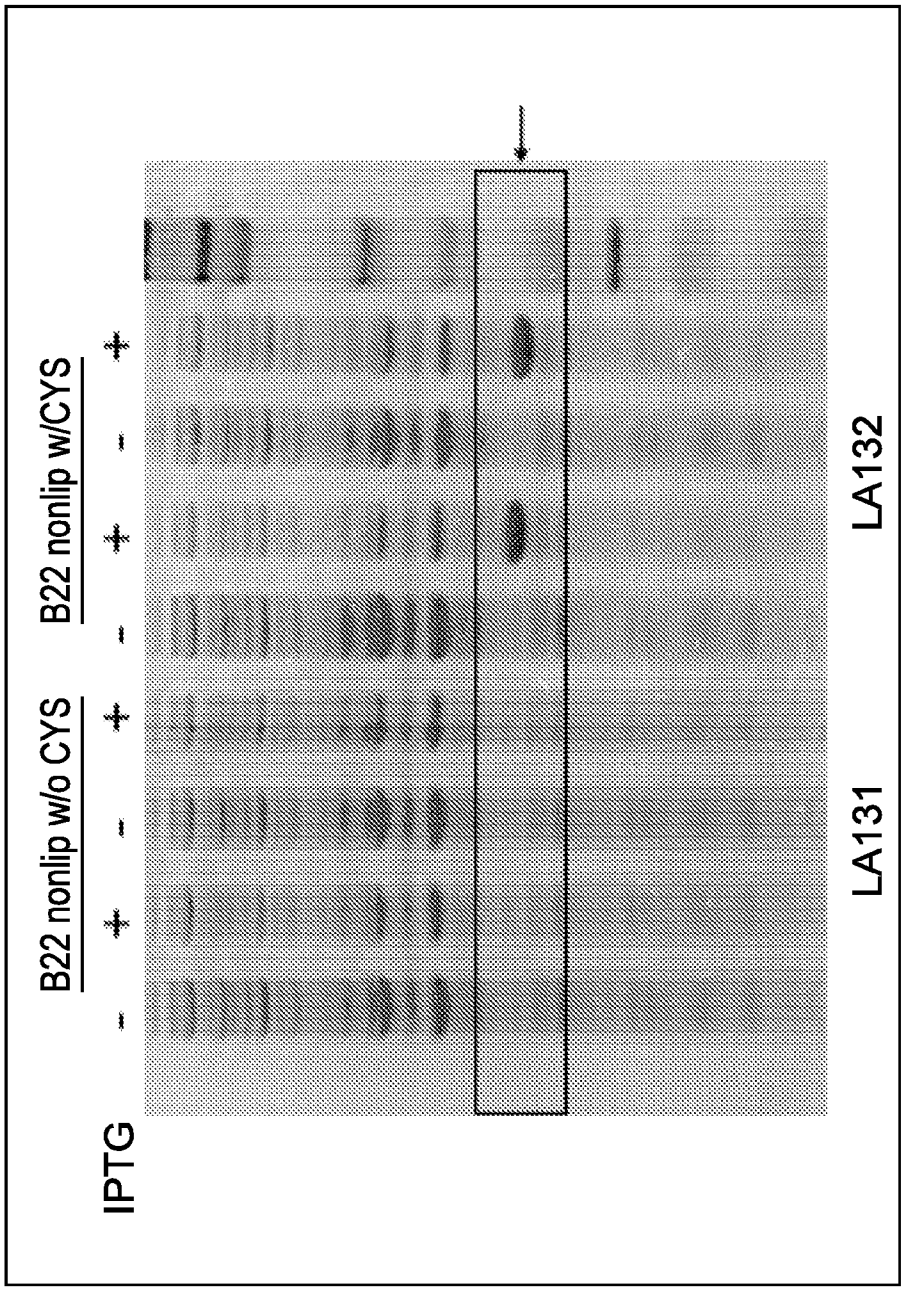

Removal of N-terminal Cys Results in Loss of Expression in E. coli
B22 nonlip w/o CYS
B22 nonlip w/CYS
IPTG
- + - + - + - +
LA131
LA132
Similar results were obtained for the CYS-minus A22 construct.

FIG. 5

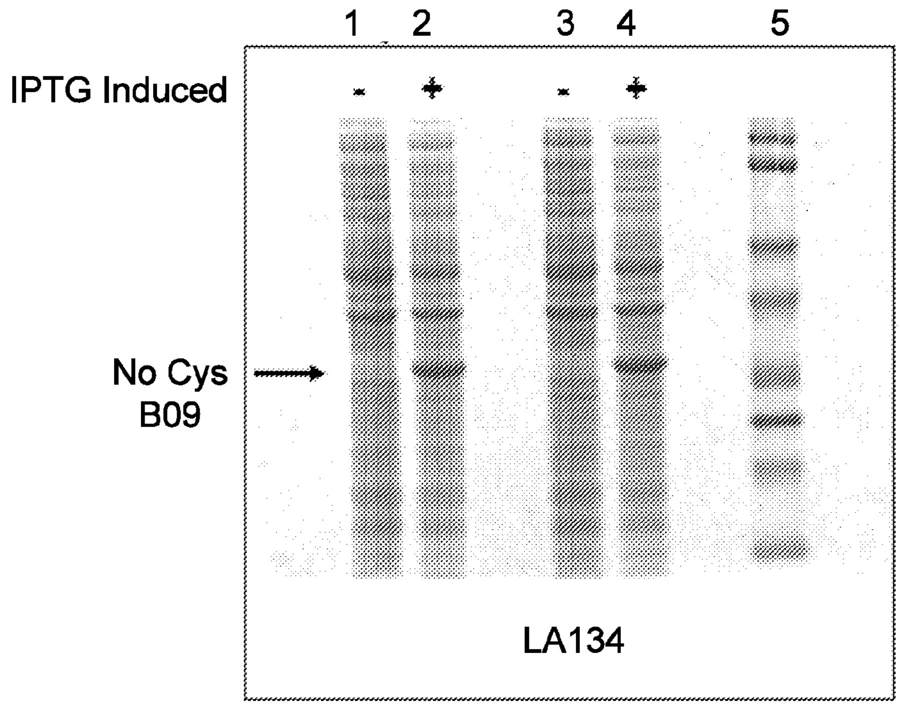
Effect of Gly/Ser Stalk Length on Non-lipidated ORF2086 Variant Expression

Protein Variant	Coomassie Expression w/o N-term Cys	Extra Gly/Ser?
B01 C**SSGGGGSGGGG**VTADIGTGLADALTAP	Yes	Yes (+5)
B44 C**SSGGGGSGGGG**VAADIGAGLADALTAP	Yes	Yes (+5)
A05 C**SSGSGSGGGG**VAADIGTGLADALTAP	Yes	Yes (+4)
A22 C**SSGGGG**VAADIGAGLADALTAP	No*	No
B22 C**SSGGGG**VAADIGAVLADALTAP	No*	No
A19 C**SSGGGG**VAADIGAGLADALTAP	No*	No

*Yes if add back N-term Cys

FIG. 6

High Levels of Non-lipidated B09 Expression Despite A Short Gly/Ser stalk



	M	S	S	G	**G**	G	G	V	A	A	D	I	**G**	A	G/V
	ATG	AGC	AGC	GGA	GGC	GGC	GGT	GTC	GCC	GCC	GAC	ATC	GGC	GCG	GGG
B22_001	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.T.
B09_004	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	...	...	...	..T	...	...
A22_001	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

FIG. 7

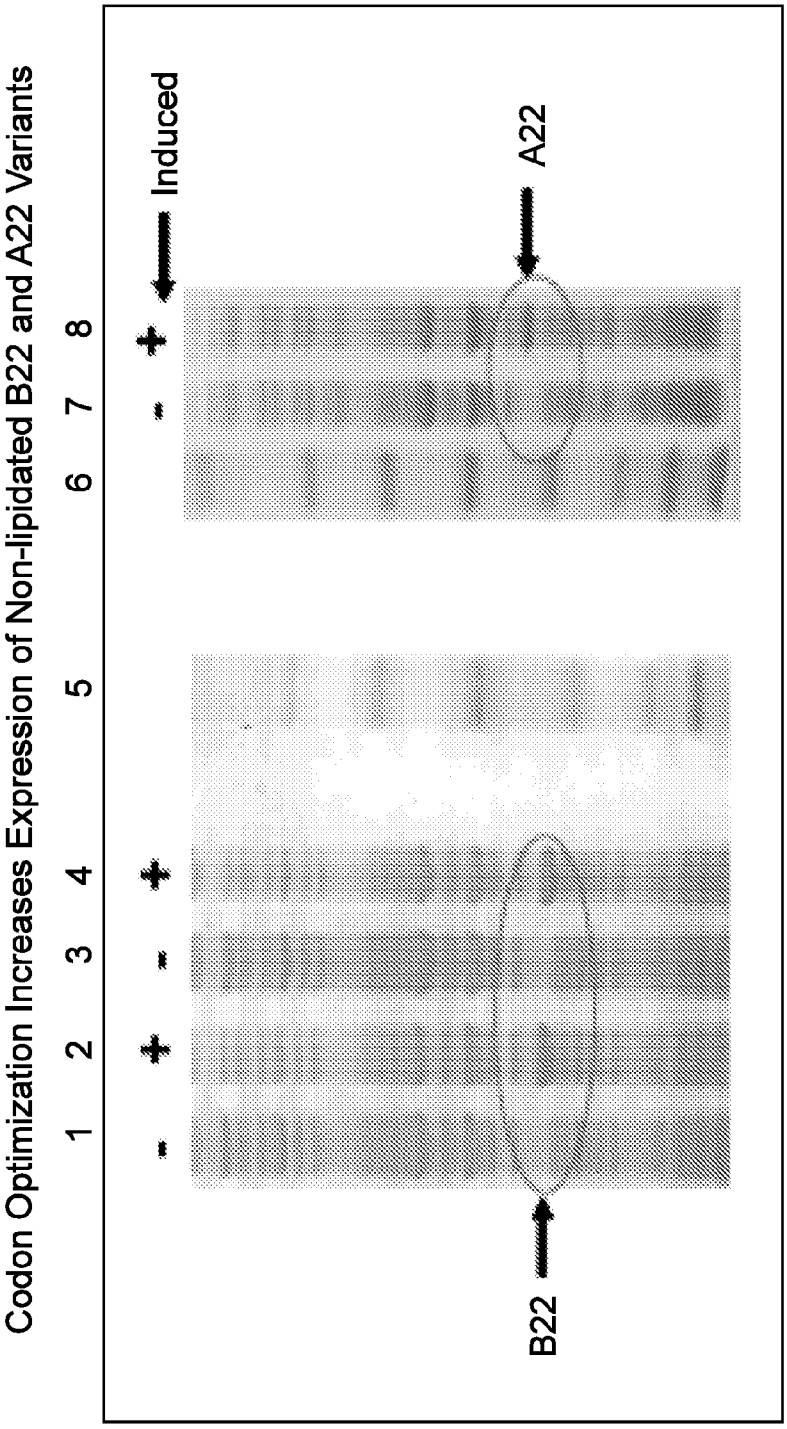

Codon Optimization Increases Expression of Non-lipidated B22 and A22 Variants
1 2 3 4 5 6 7 8
- + - + - + - +
Induced
A22
B22
N-terminal B09 Gly codon changes applied to B22 and A22

FIG. 8A

> SEQ ID NO: 43

AGCTCTGGAGGTGGAGGAAGCGGGGGCGGTGGAGTTGCAGCAGACATTGGAGCAGGATTAGCAGATGCACTGACGGCACCGT
TGGATCATAAAGACAAAGGCTTGAAATCGCTTACCTTAGAAGATTCTATTTCACAAAATGGCACCCTTACCTTGTCCGCGCA
AGGCGCTGAACGTACTTTTAAAGCCGGTGACAAAGATAATAGCTTAAATACAGGTAAACTCAAAAATGATAAAATCTCGCGT
TTTGATTTCATTCGTCAAATCGAAGTAGATGGCCAACTTATTACATTAGAAAGCGGTGAATTCCAAGTATATAAACAATCCC
ATTCAGCACTTACAGCATTGCAAACCGAACAGGTCCAAGACTCAGAACATTCCGGCAAAATGGTAGCTAAACGTCAATTCCG
CATCGGTGACATTGTCGGTGAACATACAAGCTTCGGAAAATTACCAAAAGATGTGATGGCGACCTATCGCGGTACGGCATTT
GGATCAGATGATGCAGGCGGTAAATTAACTTATACAATTGACTTTGCAGCAAAACAAGGACATGGCAAAATTGAACATTTAA
AATCTCCCGAACTTAACGTAGATCTCGCAGCAGCAGATATTAAACCAGATGAAAAACACCACGCAGTCATTTCAGGTTCAGT
TTTATACAATCAGGCAGAAAAAGGTTCGTACTCTTTAGGTATTTTTGGCGGGCAAGCTCAAGAAGTTGCAGGTAGCGCAGAA
GTAGAAACGGCAAATGGCATTCGTCACATTGGGTTAGCGGCGAAACAATAA

> SEQ ID NO: 44

SSGGGGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAERTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISR
FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMATYRGTAF
GSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAE
VETANGIRHIGLAAKQ.

FIG. 8B

> SEQ ID NO: 51

AGCAGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGCGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGCGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCGC
TCGACCATAAAGACAAAGGTTTGAAATCCCTGACATTGGAAGACTCCATTTCCCAAAACGGAACACTGACCCTGTCGGCACA
AGGTGCGGAAAGAACTTTCAAAGCCGGCGACAAAGACAACAGTCTCAACACAGGCAAACTGAAGAACGACAAAATCAGCCGC
TTCGACTTTATCCGTCAAATCGAAGTGGACGGGCAGCTCATTACCTTGGAGAGCGGAGAGTTCCAAGTGTACAAACAAAGCC
ATTCCGCCTTAACCGCCCTTCAGACCGAGCAAGTACAAGACTCGGAGCATTCCGGGAAGATGGTTGCGAAACGCCAGTTCAG
AATCGGCGACATAGTGGGCGAACATACATCTTTTGGCAAGCTTCCCAAAGACGTCATGGCGACATATCGCGGGACGGCGTTC
GGTTCAGACGATGCCGGCGGAAAACTGACCTACACCATAGATTTCGCCGCCAAGCAGGGACACGGCAAAATCGAACATTTGA
AATCGCCAGAACTCAATGTTGACCTGGCCGCCGCCGATATCAAGCCGGATGAAAAACACCATGCCGTCATCAGCGGTTCCGT
CCTTTACAACCAAGCCGAGAAAGGCAGTTACTCTCTAGGCATCTTTGGCGGGCAAGCCCAGGAAGTTGCCGGCAGCGCGGAA
GTGGAAACCGCAAACGGCATACGCCATATCGGTCTTGCCGCCAAGCAATAA

> SEQ ID NO: 45

AGCTCTGGAGGTGGAGGAAGCGGGGGCGGTGGAGTTGCAGCAGACATTGGAGCAGGATTAGCAGATGCACTGACGGCACCGT
TGGATCATAAAGACAAAGGCTTGCAGTCGCTTACCTTAGATCAGTCTGTCAGGAAAAATGAGAAACTTAAGTTGGCGGCGCA
AGGCGCTGAAAAAACTTATGGAAACGGTGACAGCTTAAATACAGGTAAACTCAAAAATGATAAAGTCTCGCGTTTTGATTTC
ATTCGTCAAATCGAAGTAGATGGCAAGCTTATTACATTAGAAAGCGGTGAATTCCAAGTATATAAACAATCCCATTCAGCAC
TTACAGCATTGCAAACCGAACAGGTCCAAGACTCAGAAGATTCCGGCAAAATGGTAGCTAAACGTCAATTCCGCATCGGTGA
CATTGCGGGTGAACATACAAGCTTCGACAAATTACCAAAAGGCGGCAGTGCGACCTATCGCGGTACGGCATTTGGATCAGAT
GATGCAGGCGGTAAATTAACTTATACAATTGACTTTGCAGCAAAACAAGGACATGGCAAAATTGAACATTTAAAATCTCCCG
AACTTAACGTAGAGCTCGCAACCGCATATATTAAACCAGATGAAAAACGCCACGCAGTCATTTCAGGTTCAGTTTTATACAA
TCAGGACGAAAAAGGTTCGTACTCTTTAGGTATTTTTGGCGGGCAAGCTCAAGAAGTTGCAGGTAGCGCAGAAGTAGAAACG
GCAAATGGCATTCACCACATTGGGTTAGCGGCGAAACAATAA

FIG. 8C

>SEQ ID NO: 50

SSGGGGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFD
FIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFG
SDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAE
VETANGIHHIGLAAKQ

> SEQ ID NO: 46

AGCTCTGGAGGTGGAGGAGTTGCAGCAGACATTGGAGCAGGATTAGCAGATGCACTGACGGCACCGTTGGATCATAAAGAC
AAAGGCTTGCAGTCGCTTACCTTAGATCAGTCTGTCAGGAAAAATGAGAAACTTAAGTTGGCGGCGCAAGGCGCTGAAAAA
ACTTATGGAAACGGTGACAGCTTAAATACAGGTAAACTCAAAAATGATAAAGTCTCGCGTTTTGATTTCATTCGTCAAATC
GAAGTAGATGGCAAGCTTATTACATTAGAAAGCGGTGAATTCCAAGTATATAAACAATCCCATTCAGCACTTACAGCATTG
CAAACCGAACAGGTCCAAGACTCAGAAGATTCCGGCAAAATGGTAGCTAAACGTCAATTCCGCATCGGTGACATTGCGGGT
GAACATACAAGCTTCGACAAATTACCAAAAGGCGGCAGTGCGACCTATCGCGGTACGGCATTTGGATCAGATGATGCAGGC
GGTAAATTAACTTATACAATTGACTTTGCAGCAAAACAAGGACATGGCAAAATTGAACATTTAAAATCTCCCGAACTTAAC
GTAGAGCTCGCAACCGCATATATTAAACCAGATGAAAAACGCCACGCAGTCATTTCAGGTTCAGTTTTATACAATCAGGAC
GAAAAAGGTTCGTACTCTTTAGGTATTTTTGGCGGGCAAGCTCAAGAAGTTGCAGGTAGCGCAGAAGTAGAAACGGCAAAT
GGCATTCACCACATTGGGTTAGCGGCGAAACAATAA

FIG. 8D

>SEQ ID NO: 47

AGCAGCGGGGGCGGTGGAGTTGCAGCAGACATTGGAGCAGGATTAGCAGATGCACTGACGGCACCGTTGGATCATAAAGACA
AAGGCTTGCAGTCGCTTACCTTAGATCAGTCTGTCAGGAAAAATGAGAAACTTAAGTTGGCGGCGCAAGGCGCTGAAAAAAC
TTATGGAAACGGTGACAGCTTAAATACAGGTAAACTCAAAAATGATAAAGTCTCGCGTTTTGATTTCATTCGTCAAATCGAA
GTAGATGGCAAGCTTATTACATTAGAAAGCGGTGAATTCCAAGTATATAAACAATCCCATTCAGCACTTACAGCATTGCAAA
CCGAACAGGTCCAAGACTCAGAAGATTCCGGCAAAATGGTAGCTAAACGTCAATTCCGCATCGGTGACATTGCGGGTGAACA
TACAAGCTTCGACAAATTACCAAAAGGCGGCAGTGCGACCTATCGCGGTACGGCATTTGGATCAGATGATGCAGGCGGTAAA
TTAACTTATACAATTGACTTTGCAGCAAAACAAGGACATGGCAAAATTGAACATTTAAAATCTCCCGAACTTAACGTAGAGC
TCGCAACCGCATATATTAAACCAGATGAAAAACGCCACGCAGTCATTTCAGGTTCAGTTTTATACAATCAGGACGAAAAAGG
TTCGTACTCTTTAGGTATTTTTGGCGGGCAAGCTCAAGAAGTTGCAGGTAGCGCAGAAGTAGAAACGGCAAATGGCATTCAC
CACATTGGGTTAGCGGCGAAACAATAA

>SEQ ID NO: 48

AGCAGCGGAGGGGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGTGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCGCTCGACCATAAAGACA
AAGGTTTGCAGTCTTTAACACTGGATCAGTCCGTCAGGAAAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAAAAC
TTATGGAAACGGCGACAGCCTTAATACGGGCAAATTGAAGAACGACAAGGTCAGCCGCTTCGACTTTATCCGTCAAATCGAA
GTGGACGGGAAGCTCATTACCTTGGAGAGCGGAGAGTTCCAAGTGTACAAACAAAGCCATTCCGCCTTAACCGCCCTTCAGA
CCGAGCAAGTACAAGACTCGGAGGATTCCGGGAAGATGGTTGCGAAACGCCAGTTCAGAATCGGCGACATAGCGGGCGAACA
TACATCTTTTGACAAGCTTCCCAAAGGCGGCAGTGCGACATATCGCGGGACGGCGTTCGGTTCAGACGATGCTGGCGGAAAA
CTGACCTATACTATAGATTTCGCCGCCAAGCAGGGACACGGCAAAATCGAACATTTGAAATCGCCCGAACTCAATGTCGAGC
TTGCCACCGCCTATATCAAGCCGGATGAAAAACGCCATGCCGTTATCAGCGGTTCCGTCCTTTACAACCAAGACGAGAAAGG
CAGTTACTCCCTCGGTATCTTTGGCGGGCAAGCCCAGGAAGTTGCCGGCAGCGCGGAAGTGGAAACCGCAAACGGCATACAC
CATATCGGTCTTGCCGCCAAGCAGTAA

FIG. 8E

>SEQ ID NO: 49

SSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIE
VDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSD
DAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVET
ANGIHHIGLAAKQ

>SEQ ID NO: 54

AGCAGCGGAAGCGGAAGCGGAGGCGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGCACAGGGCTTGCCGATGCACTAACTGCGCCGCTCG
ACCATAAAGACAAAGGTTTGAAATCCCTGACATTGGAAGACTCCATTTCCCAAAACGGAACACTGACCCTGTCGGCACAAGG
TGCGGAAAAAACTTTCAAAGTCGGCGACAAAGACAACAGTCTCAATACAGGCAAATTGAAGAACGACAAAATCAGCCGCTTC
GACTTTGTGCAAAAAATCGAAGTGGACGGACAAACCATCACGCTGGCAAGCGGCGAATTTCAAATATACAAACAGGACCACT
CCGCCGTCGTTGCCCTACAGATTGAAAAAATCAACAACCCCGACAAAATCGACAGCCTGATAAACCAACGCTCCTTCCTTGT
CAGCGGTTTGGGCGGAGAACATACCGCCTTCAACCAACTGCCCAGCGGCAAAGCCGAGTATCACGGCAAAGCATTCAGCTCC
GACGATGCCGGCGGAAAACTGACCTATACCATAGATTTTGCCGCCAAACAGGGACACGGCAAAATCGAACACCTGAAAACAC
CCGAGCAGAATGTCGAGCTTGCCTCCGCCGAACTCAAAGCAGATGAAAAATCACACGCCGTCATTTTGGGCGACACGCGCTA
CGGCAGCGAAGAAAAAGGCACTTACCACCTCGCTCTTTTCGGCGACCGAGCCCAAGAAATCGCCGGCTCGGCAACCGTGAAG
ATAAGGGAAAAGGTTCACGAAATCGGCATCGCCGGCAAACAGTAG

>SEQ ID NO: 55

SSGSGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAEKTFKVGDKDNSLNTGKLKNDKISRF
DFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSS
DDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVK
IREKVHEIGIAGKQ.

FIG. 8F

> SEQ ID NO: 57

SSGGGGSGGGGVTADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDF
IRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQEQDPEHSEKMVAKRRFRIGDIAGEHTSFDKLPKDVMATYRGTAFGSD
DAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAVAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGEKAQEVAGSAEVET
ANGIHHIGLAAKQ

> GenBank AY330406 (SEQ ID NO: 58)

CSSGGGGSGGGGVTADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQEQDPEHSEKMVAKRRFRIGDIAGEHTSFDKLPKDVMATYRGTAFGS
DDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAVAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGEKAQEVAGSAEVE
TANGIHHIGLAAKQ

>GenBank FJ184191 (SEQ ID NO: 59)

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLILDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQI
EVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFSSDDAGG
KLIYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGI
RHIGLAAKQ

> GenBank AY330385 (SEQ ID NO: 60)

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQI
EVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDASG
KLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAASDIKPDKKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGI
RHIGLAAKQ

FIG. 8G

> SEQ ID NO: 61

GGCAGCAGCGGAGGCGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGCGCGGTGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCGCTCGACCATAAAG
ACAAAAGTTTGCAGTCTTTGACGCTGGATCAGTCCGTCAGGAAAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA
AACTTATGGAAACGGCGACAGCCTCAATACGGGCAAATTGAAGAACGACAAGGTCAGCCGCTTCGACTTTATCCGTCAAATC
GAAGTGGACGGGCAGCTCATTACCTTGGAGAGCGGAGAGTTCCAAGTGTACAAACAAAGCCATTCCGCCTTAACCGCCCTTC
AGACCGAGCAAGTACAAGATTCGGAGCATTCAGGGAAGATGGTTGCGAAACGCCAGTTCAGAATCGGCGATATAGCGGGTGA
ACATACATCTTTTGACAAGCTTCCCGAAGGCGGCAGGGCGACATATCGCGGGACGGCATTCGGTTCAGACGATGCCAGTGGA
AAACTGACCTACACCATAGATTTCGCCGCCAAGCAGGGACACGGCAAAATCGAACATTTGAAATCGCCAGAACTCAATGTTG
ACCTGGCCGCCTCCGATATCAAGCCGGATAAAAAACGCCATGCCGTCATCAGCGGTTCCGTCCTTTACAACCAAGCCGAGAA
AGGCAGTTACTCTCTAGGCATCTTTGGCGGGCAAGCCCAGGAAGTTGCCGGCAGCGCAGAAGTGGAAACCGCAAACGGCATA
CGCCATATCGGTCTTGCCGCCAAGCAGTAA

> SEQ ID NO: 62

GSSGGGGVAADIGAVLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQI
EVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDASG
KLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAASDIKPDKKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGI
RHIGLAAKQ

FIG. 8H

> SEQ ID NO: 63

GGCAGCAGCGGAGGCGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGCGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCGCTCGACCATAAAG
ACAAAAGTTTGCAGTCTTTGACGCTGGATCAGTCCGTCAGGAAAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA
AACTTATGGAAACGGCGACAGCCTCAATACGGGCAAATTGAAGAACGACAAGGTCAGCCGCTTCGACTTTATCCGTCAAATC
GAAGTGGACGGGCAGCTCATTACCTTGGAGAGCGGAGAGTTCCAAATATACAAACAGGACCACTCCGCCGTCGTTGCCCTAC
AGATTGAAAAAATCAACAACCCCGACAAAATCGACAGCCTGATAAACCAACGCTCCTTCCTTGTCAGCGGTTTGGGTGGAGA
ACATACCGCCTTCAACCAACTGCCCAGCGGCAAAGCCGAGTATCACGGCAAAGCATTCAGCTCCGACGATGCTGGCGGAAAA
CTGACCTATACCATAGATTTCGCCGCCAAACAGGGACACGGCAAAATCGAACACTTGAAAACACCCGAGCAAAATGTCGAGC
TTGCCTCCGCCGAACTCAAAGCAGATGAAAAATCACACGCCGTCATTTTGGGCGACACGCGCTACGGCGGCGAAGAAAAAGG
CACTTACCACCTCGCCCTTTTCGGCGACCGCGCCCAAGAAATCGCCGGCTCGGCAACCGTGAAGATAAGGGAAAAGGTTCAC
GAAATCGGCATCGCCGGCAAACAGTAA

> SEQ ID NO: 64

GSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQI
EVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGK
LTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVH
EIGIAGKQ

FIG. 9A

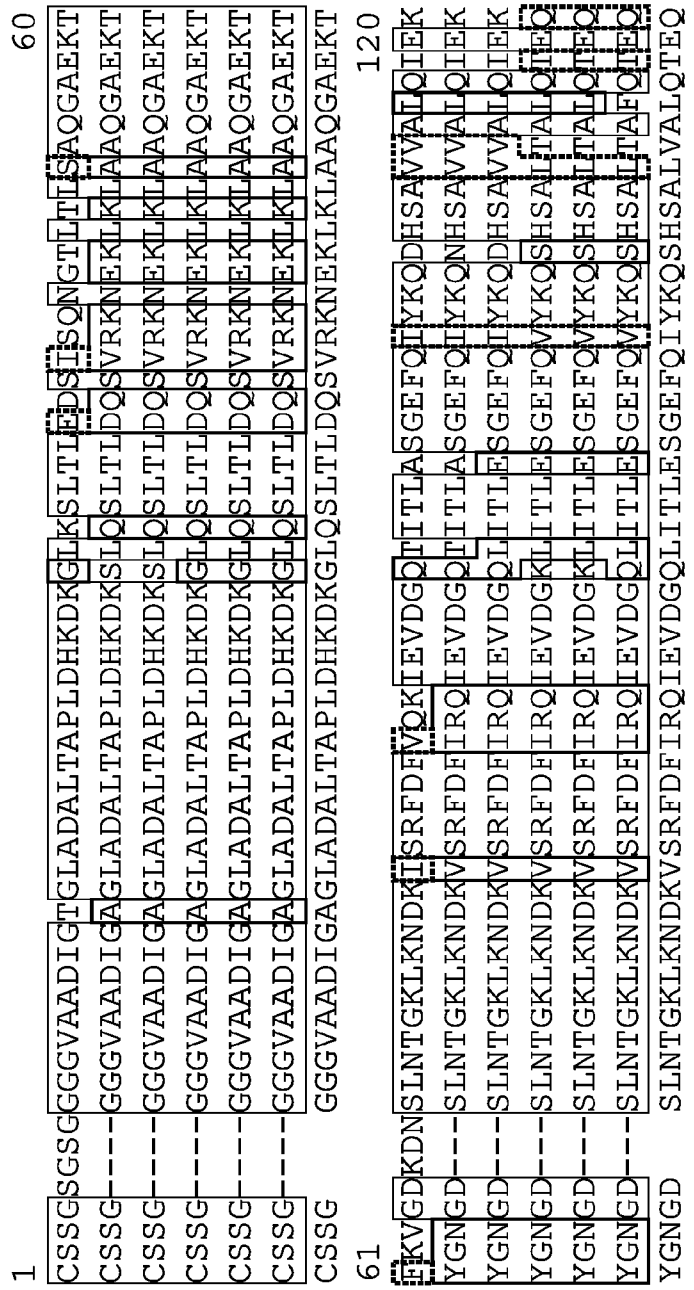
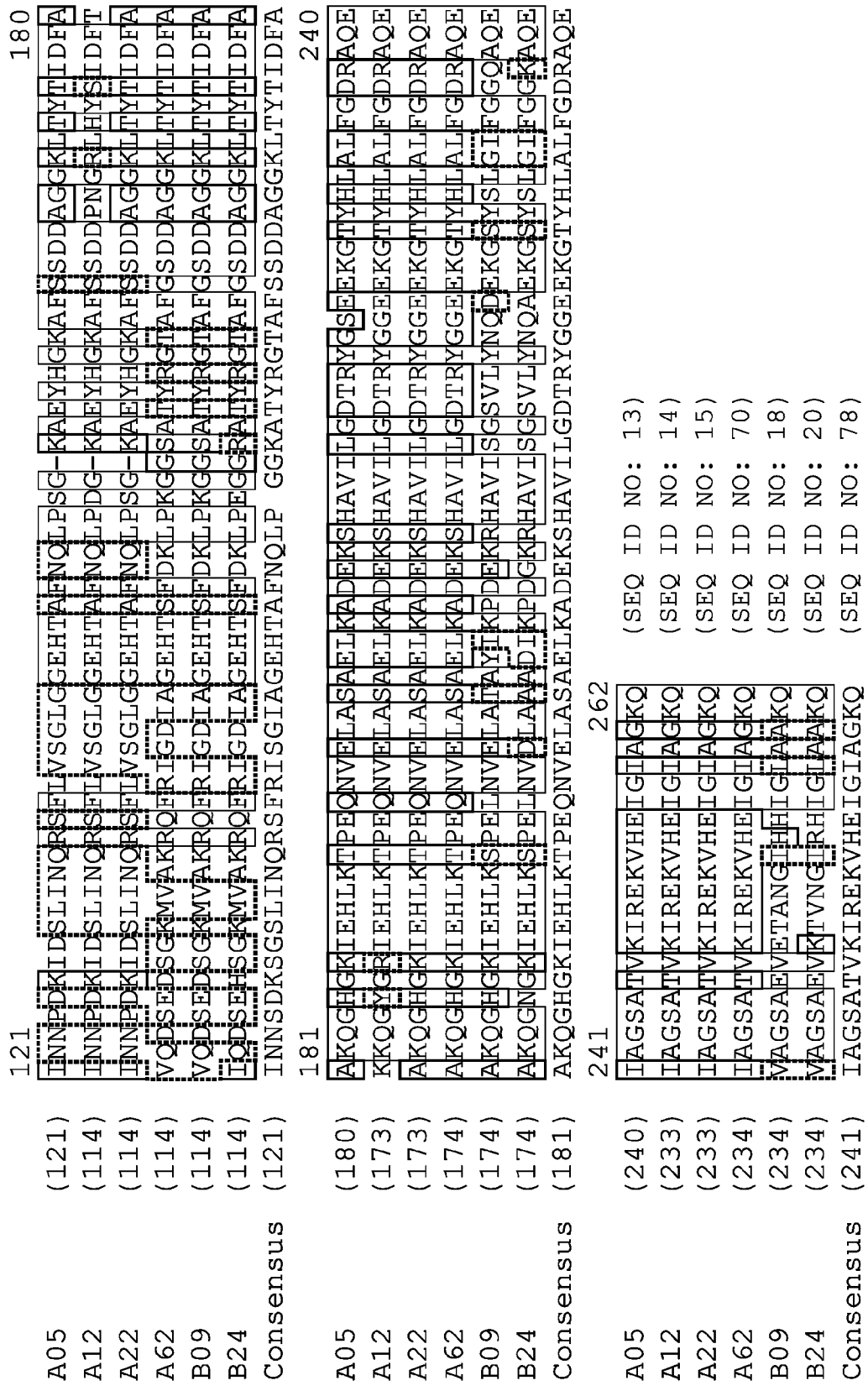

1 60
A05 (1) CSSGSGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSILSQNGTLTLSAQGAEKT
A12 (1) CSSG---GGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKT
A22 (1) CSSG---GGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKT
A62 (1) CSSG---GGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKT
B09 (1) CSSG---GGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKT
B24 (1) CSSG---GGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKT
Consensus (1) CSSG GGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKT
61 120
A05 (61) FKVGDKDNSLNTGKLKNDKTISRFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEK
A12 (57) YGNGD---SLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEK
A22 (57) YGNGD---SLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEK
A62 (57) YGNGD---SLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQIEQ
B09 (57) YGNGD---SLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQIEQ
B24 (57) YGNGD---SLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQIEQ
Consensus (61) YGNGD SLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQSHSALVALQTEQ

FIG. 9B


121
180
181
240
241
262
A05 (121) INNSDKSGSLINQRSFRISGIAGEHTAFNQLPSG-KAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFA
A12 (114) INNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDG-KAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFT
A22 (114) INNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSG-KAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFA
A62 (114) VQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSAIYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFA
B09 (114) VQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSAIYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFA
B24 (114) IQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRAIYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFA
Consensus (121) INNSDKSGSLINQRSFRISGIAGEHTAFNQLP GGKAIYRGTAFSSDDAGGKLTYTIDFA
A05 (180) AKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQE
A12 (173) KKQGQYGRIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQE
A22 (173) AKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQE
A62 (174) AKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQE
B09 (174) AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYLKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQE
B24 (174) AKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQE
Consensus (181) AKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQE
A05 (240) IAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO: 13)
A12 (233) IAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO: 14)
A22 (233) IAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO: 15)
A62 (234) IAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO: 70)
B09 (234) VAGSAEVETANGIHHIGIAAKQ (SEQ ID NO: 18)
B24 (234) VAGSAEVKTVNGIRHIGIAAKQ (SEQ ID NO: 20)
Consensus (241) IAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO: 78)

PC71917A

COMPOSICIONES DE NEISSERIA MENINGITIDIS Y MÉTODOS DE LAS MISMAS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a composiciones de *Neisseria meningitidis* y métodos de las mismas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Neisseria meningitids es una bacteria encapsulada Gram-negativa que puede provocar sepsis, meningitis y muerte. *N. meningitidis* se puede clasificar en aproximadamente 13 serogrupos (que incluyen serogrupos A, B, C, E29, H, I, K, L, W-135, X , Y y Z) con base en cápsulas de polisacáridos química y antigénicamente distintivas. Cinco de los serogrupos (A, B, C, Y, y W135) son responsables de la mayor parta de la enfermedad.

Las meningitis meningocócica es una enfermedad devastadora que puede matar a niños y adultos jóvenes en cuestión de horas independientemente de la disponibilidad de antibióticos. Existe una necesidad de composiciones inmunogénicas mejoradas contra serogrupos meningocócicos A, B, C, Y, y W135 y/o X.

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

Para satisfacer estas y otras necesidades, la presente invención se refiere a composiciones *de Neisseria meningitidis* y métodos de las mismas.

En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido aislado que incluye una secuencia de aminoácido que es al menos 95% idéntica a la SEQ ID NO: 71, donde los primeros veinte residuos de aminoácidos de la secuencia no contiene una cisteína.

En una realización, el polipéptido aislado incluye la secuencia de aminoácido en las posiciones 1 a 184 de la SEQ ID NO: 71.

En una realización, el polipéptido aislado incluye la secuencia de aminoácido en las posiciones 158 a 185 de la SEQ ID NO: 71. En otra realización, el polipéptido aislado incluye la secuencia de aminoácido en las posiciones 159 a 186 de la SEQ ID NO: 71.

En una realización, el polipéptido aislado incluye al menos 6 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácido en las posiciones 185 a 254 de la SEQ ID NO: 71.

En una realización, el polipéptido aislado es no piruvilado.

En una realización, el polipéptido aislado es no lipidado.

En una realización, el polipéptido aislado es inmunogénico.

En una realización, el polipéptido aislado incluye la secuencia de aminoácido que consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 71.

En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido aislado que incluye una secuencia de aminoácido que es al menos 95% idéntica a la SEQ ID NO: 76, donde los primeros veinte residuos de aminoácidos de la secuencia no contienen una cisteína.

En una realización, el polipéptido aislado incluye la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 76.

En una realización, el polipéptido aislado incluye la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 76, donde la cisteína en la posición 1 está suprimida. En otra realización, el polipéptido aislado incluye la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 76, donde la cisteína en la posición 1 está sustituida con un aminoácido que no es un residuo de Cys. En una realización, el polipéptido aislado incluye la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 77.

En una realización, el polipéptido aislado es no piruvilado. En una realización, el polipéptido aislado es no lipidado. En una realización, el polipéptido aislado es inmunogénico.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica que incluye el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones mencionadas con anterioridad. En otro aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica que incluye el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones descritas en la presente.

En un aspecto, la invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 71.

En una realización, la secuencia de ácido nucleico aislado incluye la SEQ ID NO: 72.

En un aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica que incluye un polipéptido ORF2086 aislado no lipidado y no piruvilado de *Neisseria meningitidis* serogrupo B, y al menos un conjugado seleccionado de: a) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo A; b) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo C; c) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo W135; y d) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo Y.

En una realización, la composición inmunogénica incluye al menos dos

conjugados seleccionados de: a) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo A; b) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo C; c) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo W135; y d) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo Y.

En una realización, la composición inmunogénica incluye al menos tres conjugados seleccionados de: a) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo A; b) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo C; c) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo W135; y d) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo Y.

En una realización, la composición inmunogénica incluye un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo A; un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C; un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo W135; y un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo Y.

En una realización, el polipéptido es una polipéptido de subfamilia A.

En una realización, el polipéptido es una polipéptido de subfamilia B.

En una realización, el polipéptido es un A05 no piruvilado y no lipidado.

En una realización, el polipéptido es un A12 no piruvilado y no lipidado.

En una realización, el polipéptido es un A22 no piruvilado y no lipidado.

En una realización, el polipéptido es un B01 no piruvilado y no lipidado.

En una realización, el polipéptido es un B09 no piruvilado y no lipidado.

En una realización, el polipéptido es un B44 no piruvilado y no lipidado.

En una realización, el polipéptido es un B22 no piruvilado y no lipidado.

En una realización, el polipéptido es un B24 no piruvilado y no lipidado.

En una realización, el polipéptido es un A62 no piruvilado y no lipidado.

En una realización, el polipéptido incluye la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 49, la SEQ ID NO: 55, la SEQ ID NO: 66, la SEQ ID NO: 68, la SEQ ID NO: 71, y la SEQ ID NO: 75. En una realización, el polipéptido incluye la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 77.

En un aspecto, la invención se refiere a un método para inducir una respuesta inmune contra *Neisseria meningitidis* en un mamífero. El método incluye la administración al mamífero de una cantidad efectiva de una composición

inmunogénica que incluye un polipéptido ORF2086 aislado no lipidado y no piruvilado de *Neisseria meningitidis* serogrupo B, y al menos un conjugado seleccionado de: a) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo A; b) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo C; c) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo W135; y d) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo Y.

En un aspecto, la invención se refiere a un método para obtener un anticuerpo bactericida contra *Neisseria meningitidis* serogrupo C en un mamífero. El método incluye la administración al mamífero de una cantidad efectiva de una composición inmunogénica que incluye un polipéptido ORF2086 aislado no lipidado y no piruvilado de *Neisseria meningitidis* serogrupo B.

En una realización, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 71 o la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, y la SEQ ID NO: 21, donde la cisteína en la posición 1 está suprimida. En otra realización, el polipéptido incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 76. Aún en otra realización, la cisteína en la posición 1 del polipéptido está suprimida. En una realización adicional, el polipéptido incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 77.

En una realización, la composición inmunogénica además incluye al menos un conjugado seleccionado de: a) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo A; b) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo C; c) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo W135; y d) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo Y.

En un aspecto, la invención se refiere a un método para obtener un anticuerpo bactericida contra *Neisseria meningitidis* serogrupo Y en un mamífero. El método incluye la administración al mamífero de una cantidad efectiva de una composición inmunogénica que incluye un polipéptido ORF2086 aislado no lipidado y no piruvilado de *Neisseria meningitidis* serogrupo B.

En una realización, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 71 o la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la

SEQ ID NO: 20, y la SEQ ID NO: 21, donde la cisteína en la posición 1 está suprimida. En otra realización, el polipéptido incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 76. Aún en otra realización, la cisteína en la posición 1 del polipéptido está suprimida. En una realización adicional, el polipéptido incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 77.

En una realización, la composición inmunogénica además incluye al menos un conjugado seleccionado de: a) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo A; b) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo C; c) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo W135; y d) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo Y.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para obtener un anticuerpo bactericida contra *Neisseria meningitidis* en un mamífero, que incluye la administración al mamífero de una cantidad efectiva de una composición inmunogénica que incluye un polipéptido ORF2086 aislado no lipidado y no piruvilado de *Neisseria meningitidis* serogrupo B, y al menos un conjugado seleccionado de: a) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo A; b) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo C; c) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo W135; y d) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo Y.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Secuencias de Ácido Nucleico de la Variante P2086.

Figura 2: Secuencias de Aminoácido de la Variante P2086. El tallo de Gly/Ser en la cola N terminal de cada variante está subrayado.

Figura 3: Estructura de la Proteína ORF2086

Figura 4: Eliminación de Resultados Cys N-terminal en Pérdida de Expresión en *E. col.*

Figura 5: Efecto de la Longitud del Tallo de Gly/Ser sobre la Expresión de Variante ORF2086 No Lipidada. La secuencia asociada con la variante de proteína marcada B01 está establecida en la SEQ ID NO: 35. La secuencia asociada con la variante de proteína marcada B44 está establecida en la SEQ ID NO: 36. La secuencia asociada con la variante de proteína marcada A05 está establecida en la SEQ ID NO: 37. La secuencia asociada con la variante de proteína marcada A22 está establecida en la SEQ ID NO: 38. La secuencia asociada con la variante de proteína marcada B22 está establecida en la SEQ ID NO: 39. La secuencia asociada con la variante de

proteína marcada A19 está establecida en la SEQ ID NO: 40.

Figura 6: Niveles Altos de Expresión B09 no lipidada independientemente de un tallo de Gly/Ser corto. Las dos líneas izquierdas demostraron la expresión de la variante B09 suprimida de Cys N-terminal antes y después de la inducción. La tercera y cuarta líneas demuestran la expresión de la variante B09 positiva de Cys N-terminal antes y después de la inducción. La línea más a la derecha es un estándar de peso molecular. La secuencia de aminoácido mostrada debajo de la imagen está establecida en la SEQ ID NO: 41. La secuencia de nucleótido representativa de la variante A22 suprimida de Cys N-terminal, denominada como “A22_001” en la figura, está establecida en la SEQ ID NO: 42, que está mostrada bajo la SEQ ID NO: 41 en la figura. La secuencia de nucleótido representativa de la variante B22 suprimida de Cys N-terminal, denominada como “B22_001” en la figura, está establecida en la SEQ ID NO: 52. La secuencia de nucleótido representativa de la variante B09 suprimida de Cys N-terminal, denominada como “B09_004” en la figura, está establecida en la SEQ ID NO: 53.

Figura 7: La Optimización de Codones Aumenta la Expresión de Variantes B22 y A22 no lipidadas. El cuadro de la izquierda demuestra la expresión de la variante B22 suprimida de Cys N-terminal antes (líneas 1 y 3) y después (líneas 2 y 4) de la inducción por IPTG. El cuadro de la derecha la expresión de la variante A22 suprimida de Cys N-terminal antes (línea 7) y después (línea 8) inducción por IPTG. Las líneas 5 y 6 son estándares de peso molecular.

Figura 8: Secuencias Ácido de Nucleico y Aminoácido de la Variante P2086

Figura 9A-9B: Alineación de Secuencia de variantes fHBP de la subfamilia A y B seleccionadas de tipo salvaje discutidas en los Ejemplos 15 a 19. Se debe destacar que la N-terminal de A62 es 100% idéntica a B09 y su C-terminal es 100% idéntica a A22. Las secuencias mostradas son A05 (SEQ ID NO: 13); A12 (SEQ ID NO: 14); A22 (SEQ ID NO: 15); A62 (SEQ ID NO: 70); B09 (SEQ ID NO: 18); B24 (SEQ ID NO: 20); y los Consensoss (SEQ ID NO: 78).

IDENTIFICADORES DE SECUENCIAS

La SEQ ID NO: 1 establece una secuencia de ADN para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 gen A04, que incluye un codón que codifica una Cys N-terminal.

La SEQ ID NO: 2 establece una secuencia de ADN para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 gen A05, que incluye un codón que codifica una Cys N-terminal.

La SEQ ID NO: 3 establece una secuencia de ADN para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 gen A12, que incluye un codón que codifica una Cys N-terminal.

La SEQ ID NO: 4 establece una secuencia de ADN para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 gen A12-2, que incluye un codón que codifica una Cys N-terminal.

La SEQ ID NO: 5 establece una secuencia de ADN para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 gen A22, que incluye un codón que codifica una Cys N-terminal.

La SEQ ID NO: 6 establece una secuencia de ADN para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 gen B02, que incluye un codón que codifica una Cys N-terminal.

La SEQ ID NO: 7 establece una secuencia de ADN para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 gen B03, que incluye un codón que codifica una Cys N-terminal.

La SEQ ID NO: 8 establece una secuencia de ADN para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 gen B09, que incluye un codón que codifica una Cys N-terminal.

La SEQ ID NO: 9 establece una secuencia de ADN para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 gen B22, que incluye un codón que codifica una Cys N-terminal.

La SEQ ID NO: 10 establece una secuencia de ADN para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 gen B24, que incluye un codón que codifica una Cys N-terminal.

La SEQ ID NO: 11 establece una secuencia de ADN para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 gen B44, que incluye un codón que codifica una Cys N-terminal.

La SEQ ID NO: 12 establece la secuencia de aminoácido para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 A04, que incluye una Cys N-terminal en la posición de aminoácido 1.

La SEQ ID NO: 13 establece la secuencia de aminoácido para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 A05, que incluye una Cys N-terminal en la posición de aminoácido 1.

La SEQ ID NO: 14 establece la secuencia de aminoácido para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 A12, que incluye una Cys N-terminal en la

posición de aminoácido 1.

La SEQ ID NO: 15 establece la secuencia de aminoácido para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 A22, que incluye una Cys N-terminal en la posición de aminoácido 1.

La SEQ ID NO: 16 establece la secuencia de aminoácido para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 B02, que incluye una Cys N-terminal en la posición de aminoácido 1.

La SEQ ID NO: 17 establece la secuencia de aminoácido para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 B03, que incluye una Cys N-terminal en la posición de aminoácido 1.

La SEQ ID NO: 18 establece la secuencia de aminoácido para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 B09, que incluye una Cys N-terminal en la posición de aminoácido 1.

La SEQ ID NO: 19 establece la secuencia de aminoácido para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 B22, que incluye una Cys N-terminal en la posición de aminoácido 1.

La SEQ ID NO: 20 establece la secuencia de aminoácido para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 B24, que incluye una Cys N-terminal en la posición de aminoácido 1.

La SEQ ID NO: 21 establece la secuencia de aminoácido para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 B44, que incluye una Cys N-terminal en la posición de aminoácido 1.

La SEQ ID NO: 22 establece una secuencia de ADN para un cebador directo, mostrada en el Ejemplo 2.

La SEQ ID NO: 23 establece una secuencia de ADN para un cebador inverso, mostrada en el Ejemplo 2.

La SEQ ID NO: 24 establece una secuencia de ADN para un cebador directo, mostrada en el Ejemplo 2, Tabla 1.

La SEQ ID NO: 25 establece una secuencia de ADN para un cebador inverso, mostrada en el Ejemplo 2, Tabla 1.

La SEQ ID NO: 26 establece una secuencia de ADN para un cebador directo, mostrada en el Ejemplo 2, Tabla 1.

La SEQ ID NO: 27 establece una secuencia de ADN para un cebador inverso, mostrada en el Ejemplo 2, Tabla 1.

La SEQ ID NO: 28 establece una secuencia de ADN para un tallo de Gly/Ser,

mostrada en el Ejemplo 4.

La SEQ ID NO: 29 establece la secuencia de aminoácido para un tallo de Gly/Ser, mostrada en el Ejemplo 4, que está codificada por, por ejemplo, la SEQ ID NO: 28.

La SEQ ID NO: 30 establece una secuencia de ADN para un tallo de Gly/Ser, mostrada en el Ejemplo 4.

La SEQ ID NO: 31 establece la secuencia de aminoácido para un tallo de Gly/Ser, mostrada en el Ejemplo 4, que está codificada por, por ejemplo, la SEQ ID NO: 30.

La SEQ ID NO: 32 establece una secuencia de ADN para un tallo de Gly/Ser, mostrada en el Ejemplo 4.

La SEQ ID NO: 33 establece la secuencia de aminoácido para un tallo de Gly/Ser, que está codificada por, por ejemplo, la SEQ ID NO: 32 y la SEQ ID NO: 34.

La SEQ ID NO: 34 establece una secuencia de ADN para un tallo de Gly/Ser, mostrada en el Ejemplo 4.

La SEQ ID NO: 35 establece la secuencia de aminoácido para la terminal N de *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 B01, mostrada en la Figura 5.

La SEQ ID NO: 36 establece la secuencia de aminoácido para la terminal N de *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 B44, mostrada en la Figura 5.

La SEQ ID NO: 37 establece la secuencia de aminoácido para la terminal N de *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 A05, mostrada en la Figura 5.

La SEQ ID NO: 38 establece la secuencia de aminoácido para la terminal N de *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 A22, mostrada en la Figura 5.

La SEQ ID NO: 39 establece la secuencia de aminoácido para la terminal N de *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 B22, mostrada en la Figura 5.

La SEQ ID NO: 40 establece la secuencia de aminoácido para la terminal N de *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 A19, mostrada en la Figura 5.

La SEQ ID NO: 41 establece la secuencia de aminoácido para la terminal N de a *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086, mostrada en la Figura 6.

La SEQ ID NO: 42 establece una secuencia de ADN para la terminal N de *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 A22, mostrada en la Figura 6.

La SEQ ID NO: 43 establece una secuencia de ADN optimizada de codones para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 gen B44, donde el codón que codifica una cisteína N-terminal está suprimido, en comparación con la SEQ ID NO: 11. El plásmido pDK087 incluye la SEQ ID NO: 43.

La SEQ ID NO: 44 establece la secuencia de aminoácido para un *N. meningitidis*, serogrupo B, no lipidado variante 2086 B44. La SEQ ID NO: 44 es idéntica a la SEQ ID NO: 21 donde la cisteína N-terminal en la posición 1 de la SEQ ID NO: 21 está suprimida. La SEQ ID NO: 44 está codificada por, por ejemplo, la SEQ ID NO: 43.

La SEQ ID NO: 45 establece una secuencia de ADN optimizada de codones para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 gen B09, donde el codón que codifica una cisteína N-terminal está suprimido, y donde la secuencia incluye codones que codifican una región Gly/Ser adicional, en comparación con la SEQ ID NO: 8. El plásmido pEB063 incluye la SEQ ID NO: 45.

La SEQ ID NO: 46 establece una secuencia de ADN optimizada de codones para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 gen B09, donde el codón que codifica una cisteína N-terminal está suprimido, en comparación con la SEQ ID NO: 8. El plásmido pEB064 incluye la SEQ ID NO: 46.

La SEQ ID NO: 47 establece una secuencia de ADN optimizada de codones para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 gen B09, donde el codón que codifica una cisteína N-terminal está suprimido, en comparación con la SEQ ID NO: 8. El plásmido pEB 065 incluye la SEQ ID NO: 47.

La SEQ ID NO: 48 establece una secuencia de ADN para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 gen B09, donde el codón que codifica una cisteína N-terminal está suprimido, en comparación con la SEQ ID NO: 8. El plásmido pLA134 incluye la SEQ ID NO: 48.

La SEQ ID NO: 49 establece la secuencia de aminoácido para un *N. meningitidis* no lipidado, serogrupo B, variante 2086 B09. La SEQ ID NO: 49 es idéntica a la SEQ ID NO: 18 donde la cisteína N-terminal en la posición 1 de la SEQ ID NO: 18 está suprimida. SEQ ID 49 está codificada por, por ejemplo, una secuencia de ADN seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 46, la SEQ ID NO: 47, y la SEQ ID NO: 48.

La SEQ ID NO: 50 establece la secuencia de aminoácido para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 B09, donde el codón que codifica una cisteína N-terminal está suprimido y donde la secuencia incluye codones que codifican una región Gly/Ser adicional, en comparación con la SEQ ID NO: 18. La SEQ ID NO: 50 está codificada por, por ejemplo, la SEQ ID NO: 45.

La SEQ ID NO: 51 establece una secuencia de ADN para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 gen B44, donde el codón que codifica una cisteína N-

terminal está suprimido, en comparación con la SEQ ID NO: 11. El plásmido pLN056 incluye la SEQ ID NO: 51.

La SEQ ID NO: 52 establece una secuencia de ADN para la terminal N de *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 B22, mostrada en la Figura 6.

La SEQ ID NO: 53 establece una secuencia de ADN para la terminal N de *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 B09, mostrada en la Figura 6.

La SEQ ID NO: 54 establece una secuencia de ADN para un *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086, gen A05, donde el codón que codifica una cisteína N-terminal está suprimido, en comparación con la SEQ ID NO: 2.

La SEQ ID NO: 55 establece la secuencia de aminoácido para un *N. meningitidis* no lipidado, serogrupo B, variante 2086 A05. La SEQ ID NO: 55 es idéntica a la SEQ ID NO: 13 donde la cisteína N-terminal en la posición 1 de la SEQ ID NO: 13 está suprimida. La SEQ ID NO: 55 está codificada por, por ejemplo, la SEQ ID NO: 54.

La SEQ ID NO: 56 establece la secuencia de aminoácido de una secuencia repetida de serina-glicina, mostrada en el Ejemplo 7.

La SEQ ID NO: 57 establece la secuencia de aminoácido para un *N. meningitidis* no lipidado, serogrupo B, variante 2086 B01. La SEQ ID NO: 57 es idéntica a la SEQ ID NO: 58 donde la cisteína N-terminal en la posición 1 de la SEQ ID NO: 58 está suprimida.

La SEQ ID NO: 58 establece la secuencia de aminoácido para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 B01, que incluye una Cys N-terminal en la posición de aminoácido 1.

La SEQ ID NO: 59 establece la secuencia de aminoácido para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 B15, que incluye una Cys N-terminal en la posición de aminoácido 1.

La SEQ ID NO: 60 establece la secuencia de aminoácido para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 B16, que incluye una Cys N-terminal en la posición de aminoácido 1.

La SEQ ID NO: 61 establece una secuencia de ADN para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 B22, en la que el codón para la Cys N-terminal en la posición de aminoácido 1 de la SEQ ID NO: 19 está reemplazado por un codón para una Glicina.

La SEQ ID NO: 62 establece la secuencia de aminoácido para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 B22, en la que la Cys N-terminal en la

posición de aminoácido 1 de la SEQ ID NO: 19 está reemplazado por una Glicina.

La SEQ ID NO: 63 establece una secuencia de ADN para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 A22, en la que el codón para la Cys N-terminal en la posición de aminoácido 1 de la SEQ ID NO: 15 está reemplazado por un codón para una Glicina.

La SEQ ID NO: 64 establece la secuencia de aminoácido para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 A22, en la que la Cys N-terminal en la posición de aminoácido 1 de la SEQ ID NO: 15 está reemplazado por una Glicina.

La SEQ ID NO: 65 establece una secuencia de ADN optimizada de codones (pEB042) que codifica un polipéptido no lipidado y no piruvilado A05.

La SEQ ID NO: 66 establece la secuencia de aminoácido para un *N. meningitidis* no lipidado, serogrupo B, variante 2086 A12. La SEQ ID NO: 66 es idéntica a la SEQ ID NO: 14 donde la cisteína N-terminal en la posición 1 de la SEQ ID NO: 14 está suprimida. La SEQ ID NO: 66 está codificada por, por ejemplo, la SEQ ID NO: 67.

La SEQ ID NO: 67 establece una secuencia de ADN optimizada de codones para un polipéptido no lipidado y no piruvilado A12.

La SEQ ID NO: 68 establece la secuencia de aminoácido para un *N. meningitidis* no lipidado, serogrupo B, variante 2086 A22. La SEQ ID NO: 68 es idéntica a la SEQ ID NO: 15 donde la cisteína N-terminal en la posición 1 de la SEQ ID NO: 15 está suprimida. La SEQ ID NO: 68 está codificada por, por ejemplo, la SEQ ID NO: 69.

La SEQ ID NO: 69 establece una secuencia de ADN optimizada de codones para un polipéptido no lipidado y no piruvilado A22.

La SEQ ID NO: 70 establece la secuencia de aminoácido para el *N. meningitidis* serogrupo B, variante 2086 A62, que incluye una Cys N-terminal en la posición de aminoácido 1.

La SEQ ID NO: 71 establece la secuencia de aminoácido para un *N. meningitidis* no lipidado, serogrupo B, variante 2086 A62. La SEQ ID NO: 71 es idéntica a la SEQ ID NO: 70 donde la cisteína N-terminal en la posición 1 de la SEQ ID NO: 70 está suprimida.

La SEQ ID NO: 72 establece una secuencia de ADN optimizada de codones para la SEQ ID NO: 71.

La SEQ ID NO: 73 establece una secuencia de ADN optimizada de codones (pDK086) para un *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 gen A05, donde el

codón que codifica una cisteína N-terminal está suprimido, en comparación con la SEQ ID NO: 2.

La SEQ ID NO: 74 establece la secuencia de aminoácido para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 A29, que incluye una Cys N-terminal en la posición de aminoácido 1.

La SEQ ID NO: 75 establece la secuencia de aminoácido para un *N. meningitidis* no lipidado, serogrupo B, variante 2086 B22. La SEQ ID NO: 75 es idéntica a la SEQ ID NO: 19 donde la cisteína N-terminal en la posición 1 de la SEQ ID NO: 19 está suprimida.

La SEQ ID NO: 76 establece la secuencia de aminoácido para un *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 A05.

La SEQ ID NO: 77 establece la secuencia de aminoácido para un *N. meningitidis* no lipidado, serogrupo B, variante 2086 A05. La SEQ ID NO: 77 es idéntica a la SEQ ID NO: 19 donde la cisteína N-terminal en la posición 1 de la SEQ ID NO: 76 no está presente.

La SEQ ID NO: 78 establece la secuencia de aminoácido para una secuencia de consenso mostrada en la FIG. 9A-9B.

La SEQ ID NO: 79 es idéntica a la SEQ ID NO: 78 excepto que la Cys en la posición 1 de la SEQ ID NO: 78 no está presente.

La SEQ ID NO: 80 establece la secuencia de aminoácido para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 B24. La SEQ ID NO: 80 es idéntica a la SEQ ID NO: 20 donde la cisteína N-terminal en la posición 1 de la SEQ ID NO: 20 está suprimida.

La SEQ ID NO: 81 establece la secuencia de aminoácido para el *N. meningitidis*, serogrupo B, variante 2086 B24. La SEQ ID NO: 81 es idéntica a la SEQ ID NO: 20 en donde los residuos en la posición 1 a 3 de la SEQ ID NO: 20 se suprimen.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que el que se conoce comúnmente por aquellos con experiencia ordinaria en la técnica a los cuales pertenece esta invención. Si bien se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos que se describen en la presente en la práctica o pruebas de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. Los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos, y no pretenden ser

limitantes. Todas las publicaciones, patentes y otros documentos mencionados en la presente se incorporan como referencia en su totalidad.

Definiciones

El término "antígeno" por lo general se refiere a una molécula biológica, normalmente una proteína, péptido, polisacárido, lípido o conjugado que contiene al menos un epítopo al cual se puede unir en forma selectiva un anticuerpo cognado; o en algunas instancias a una sustancia inmunogénica que puede estimular la producción de anticuerpos o respuestas de células T, o ambas, en un animal, que incluye composiciones que se inyectan o absorbe en un animal. La respuesta inmune se puede generar para toda la molécula, o para una o más varias porciones de la molécula (*por ej.*, un epítopo o hapteno). El término se puede utilizar para referirse a una molécula individual o a una población homogénea o heterogénea de moléculas antigénicas. Un antígeno está reconocido por anticuerpos, receptores de células T u otros elementos de inmunidad específica humoral y/o celular. El término "antígeno" incluye todos los epítopos antigénicos relacionados. Los epítopos de un antígeno dado se pueden identificar por el uso de cualquier número de técnicas de mapeo de epítopos, muy conocidas en la técnica. Véase, *por ej.*, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, N. J. Por ejemplo, los epítopos lineales se pueden determinar por medio de *por ej.*, la síntesis simultánea de un gran número de péptidos sobre soportes sólidos, los péptidos correspondientes a porciones de la molécula de proteína, y por medio de la reacción de los péptidos con anticuerpos mientras que los péptidos aún están adjuntos a los soportes. Tales técnicas son conocidas en la técnica y se describen, *por ej.*, en la Patente de los Estados Unidos N.° 4.708.871; Geysen et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998 a 4002; Geysen et al. (1986) *Molec. Immunol.* 23:709 a 715, todos se incorporan como referencia en sus totalidades en la presente. En forma similar, los epítopos conformacionales se pueden identificar por medio de la determinación de la conformación espacial de aminoácidos tales como, *por ej.*, por medio de cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, *por ej.*, Epitope Mapping Protocols, *supra*. Además, para los propósitos de la presente invención, un "antígeno" también se pueden utilizar para referirse a una proteína que incluye modificaciones, tales como supresiones, adiciones y sustituciones (por lo general son conservativas por naturaleza, pero pueden ser no conservativas), con la secuencia nativa, con la condición de que la proteína mantenga la capacidad de obtener una respuesta inmunológica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas,

como en el caso de mutagénesis dirigida al sitio, o a través de procedimientos sintético particulares, o a través de un enfoque de manipulación genética, o pueden ser accidentales, tales como a través de mutaciones de huéspedes, que producen los antígenos. Además, el antígeno se puede derivar, obtener, o aislar de un microbio, *por ej.* una bacteria, o puede ser un organismo completo. En forma similar, un oligonucleótido o polinucleótido, que expresa un antígeno, tal como en las aplicaciones de inmunización por ácido nucleico, también se incluye en la definición. Los antígenos sintéticos también están incluidos, por ejemplo, poliepítopos, epítopos de flanqueo, y otros antígenos recombinantes o derivados en forma sintética (Bergmann et al. (1993) *Eur. J. Immunol.* 23:2777 a 2781; Bergmann et al. (1996) *J. Immunol.* 157:3242 a 3249; Suhrbier, A. (1997) *Immunol. y Cell Biol.* 75:402 a 408; Gardner et al. (1998) 12th World AIDS Conference, Geneva, Suiza, 28 de Jun. al 3 de Jul., 1998).

El término sustituciones de aminoácidos "conservativas" se puede llevar a cabo con base en la similitud en cuanto a la polaridad, carga, solubilidad hidrofobicidad, hidrofilicidad, y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrofóbicos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, triptofano, y metionina; los aminoácidos polares/neutrales incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, y glutamina; los aminoácidos cargados en forma positiva (básicos) incluyen arginina, lisina, e histidina; y los aminoácidos cargados en forma negativa (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. En algunas realizaciones, los cambios de aminoácido conservativos alteran la secuencia primaria de los polipéptidos ORF2086, pero no alteran la función de la molécula. Cuando se generan estos mutantes, se puede considerar el índice hidropático de aminoácidos. La importancia del índice hidropático de aminoácidos en la atribución de la función biológica interactiva en un polipéptido por lo general se comprende en la técnica (Kyte & Doolittle, 1982, J. Mol. Biol., 157(1):105 a 32). Se sabe que ciertos aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos que tienen un similar índice hidropático o puntaje y aún dar lugar a un polipéptido con actividad biológica similar. Cada aminoácido se ha asignado a un índice hidropático con base en sus características de hidrofobicidad y carga. Estos índices son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptofano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

Se cree que el carácter hidropático relativo del residuo de aminoácido

determina la estructura secundaria y terciaria del polipéptido resultante, que a su vez define la interacción del polipéptido con otras moléculas, tales como enzimas, sustratos, receptores, anticuerpos, antígenos, y similares. Se conoce en la técnica que un aminoácido se puede sustituir por otro aminoácido que tiene un índice hidropático similar y aún obtener un polipéptido funcionalmente equivalente. En tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de +/-2, se prefieren en particular aquellos dentro de +/-1, y se prefiere aún más en particular aquellos dentro de +/-0,5.

Las sustituciones o inserciones de aminoácidos conservativos también se pueden llevar a cabo con base en la hidrofilicidad. De acuerdo con lo descripto en la Patente de los Estados Unidos N.° 4.554.101, que se incorpora como referencia en la presente, la mayor hidrofilicidad promedio local de un polipéptido, de acuerdo con lo gobernado por la hidrofilicidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, *es decir*, con una propiedad biológica del polipéptido. La Patente de los Estados Unidos N.° 4.554.101 recita que los siguientes valores de hidrofilicidad se han asignado a los residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0±1); glutamato (+3,0±1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); prolina (-0,5±1); treonina (-0,4); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptofano (-3,4). Se comprende que un aminoácido se puede sustituir por otro que tenga un valor de hidrofilicidad similar y aún obtener un polipéptido biológicamente equivalente, y en particular, un polipéptido inmunológicamente equivalente. En tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilicidad están dentro de ±2; en particular se prefieren aquellos dentro de ±1; y aún más en particular se prefieren aquellos dentro de ±0,5. Las sustituciones representativas que toman en consideración varias de las características anteriores son muy conocidas para aquellos con experiencia en la técnica e incluyen, sin limitación: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

El término " cantidad inmunogénica efectiva" de acuerdo con lo utilizado en la presente se refiere a una cantidad de un polipéptido o composición que comprende un polipéptido que es efectiva para obtener una respuesta inmune en un huésped vertebrado. Por ejemplo, una cantidad inmunogénica efectiva de una proteína rLP2086 de esta invención es una cantidad que es efectiva para obtener una respuesta inmune en un huésped vertebrado. La " dosificación o cantidad inmunogénico efectiva"

particular dependerá de la edad, el peso y la condición médica del huésped, así como también del método de administración. Las dosis adecuadas se determinan con facilidad por aquellos con experiencia en la técnica.

El término "tallo de Gly/Ser" de acuerdo con lo utilizado en la presente se refiere a la serie de residuos Gly y Ser inmediatamente corriente abajo del residuo de la Cys N-terminal de una proteína codificada por ORF2086. Puede haber entre 5 y 12 residuos de Gly y Ser en el tallo de Gly/Ser. Por consiguiente, el tallo de Gly/Ser consiste en los aminoácidos 2 a entre 7 y 13 de la proteína codificada por ORF2086. Con preferencia, el tallo de Gly/Ser consiste en los aminoácidos 2 y hasta entre 7 y 13 de la proteína codificada por ORF2086. Los tallos de Gly/Ser de las variantes P2086 de la presente invención están representados por las secuencias subrayadas en la Figura 2 (SEQ ID NOs: 12 a 21). De acuerdo con lo mostrado en la presente, la longitud del tallo de Gly/Ser puede afectar la estabilidad o nivel de expresión de una variante P2086 no lipidada. En una realización representativa, los efectos de afectar la longitud del tallo de Gly/Ser se comparan con aquellos de la variante de tipo salvaje correspondiente.

El término "inmunogénico" se refiere a la capacidad de un antígeno o una vacuna para obtener una respuesta inmune, ya sea humoral o mediada por células, o ambas.

Una "cantidad inmunogénica", o una " cantidad inmunológicamente efectiva" o "dosis", cada uno de los se utilizan en forma intercambiable en la presente, por lo general se refiere a la cantidad de antígeno o composición inmunogénica suficiente para obtener una respuesta inmune, ya sea una respuesta celular (célula T) o humoral (célula B o anticuerpo), o ambas, de acuerdo con lo medido por medio de ensayos estándares conocidos para aquellos con experiencia en la técnica.

El término "composición inmunogénica" se refiere a cualquier composición farmacéutica que contiene un antígeno, *por ej.* un microorganismo, o un componente de los mismos, dicha composición se puede utilizar para obtener una respuesta inmune en un sujeto. Las composiciones inmunogénicas de la presente invención se pueden utilizar para tratar a un ser humano susceptible a una infección por *N. meningidis*, por medio de la administración de las composiciones inmunogénicas a través de una vía sistémica transdérmica o mucosal. Estas administraciones pueden incluir inyección a través de las vías intramusculares (i.m.), intraperitoneales (i.p.), intradérmica (i.d.) o subcutáneas; la aplicación por medio de un parche u otro dispositivo de administración transdérmica; o a través de administración mucosal en

los tractos oral/alimentarios, respiratorios o genitourinarios. En una realización, la composición inmunogénica se puede utilizar en la elaboración de una vacuna o en la obtención de un anticuerpo policlonal o monoclonal que se podría utilizar para proteger o tratar un sujeto en forma pasiva.

Las cantidades óptimas de componentes para una composición inmunogénica particular se pueden determinar por medio de estudios estándares que implican la observación de respuestas inmunes apropiadas en sujetos. Luego de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo separadas en forma adecuada.

El término "aislado" significa que el material se retira se un ambiente original (*por ej.*, el ambiente natural si aparece en forma natural o de su organismo huésped si es una entidad recombinante, o si se toma de un ambiente para un ambiente diferente). Por ejemplo, una proteína o péptido "aislado" está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente celular o tisular de cual está derivada la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos cuando está químicamente sintetizada, o de lo contrario está presente en una mezcla como parte de una reacción química. En la presente invención, las proteínas pueden estar aisladas de la célula bacteriana o de restos celulares, de manera tal que se proporcionan en una forma útil en la elaboración de una composición inmunogénica. El término "aislado" o "aislación" puede incluir purificar, o la purificación, que incluye por ejemplo, los métodos de purificación de las proteínas, de acuerdo con lo descripto en la presente. La frase "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de un polipéptido o proteína en la que el polipéptido o proteína está separada de los componentes celulares de las células de las cuales está aislado o producido en forma recombinante. Por lo tanto, una proteína o péptido que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones del polisacárido, proteína o péptido en cápsula que tiene menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, o 1%, (en peso seco) de proteína o polisacárido u otro material celular contaminante. Cuando el polipéptido/proteína está producido en forma recombinante, también con preferencia está sustancialmente libre del medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, 10%, o 5% del volumen de la preparación de la proteína. Cuando un polipéptido o proteína está producida por medio de síntesis química, con preferencia está sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos, es decir, está separado de precursores químicos u otros químicos que están implicados en la síntesis de la proteína o polisacárido. Por

consiguiente, tales preparaciones del polipéptido o proteína tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5% (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos al polipéptido/proteína o fragmento de polisacárido de interés.

El término "cola de la N terminal" de acuerdo con lo utilizado en la presente se refiere a la porción N-terminal de una proteína codificada por ORF2086, que adjunta la proteína a la membrana celular. Una cola de la N terminal se muestra en la parte inferior de la estructura en vista lateral en la Figura 3. Una cola de la N terminal en forma típica comprende los 16 aminoácidos N-terminales de la proteína codificada por ORF2086. En algunas realizaciones, la cola de la N terminal son los aminoácidos 1 a 16 de cualquiera de las SEQ ID NOs: 12 a 21.El término "ORF2086" de acuerdo con lo utilizado en la presente se refiere al Marco de Lectura Abierto 2086 de las bacterias de la especie *Neisseria*. La ORF2086 de *Neisseria*, las proteínas codificadas del mismo, los fragmentos de esas proteínas, y las composiciones inmunogénicas que comprenden esas proteínas son conocidas en la técnica y se describen, por ej., en WO2003/063766, y en Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.° US 20060257413 y US 20090202593, cada uno de cuales se incorpora como referencia en su totalidad en la presente.

El término “P2086” por lo general se refiere a la proteína codificada por ORF2086. La “P” antes de “2086” es una abreviatura de “proteína.” Las proteínas P2086 de la invención pueden ser lipidadas o no lipidadas. “LP2086” y “P2086” en forma típica se refieren a formas lipidadas y no lipidadas de una proteína 2086, respectivamente. La proteína P2086 de la invención puede ser recombinante. “rLP2086” y “rP2086” en forma típica se refieren a las formas lipidadas y no lipidadas de una proteína 2086 recombinante, respectivamente. “2086” también se conoce como la proteína de unión al factor H (fHBP) debido a su capacidad para unirse al factor H.

El término "diluyente, excipiente, y/o portador aceptables para uso farmacéutico" de acuerdo con lo utilizado en la presente pretende incluir cualquier y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, y similares, compatibles con la administración a seres humanos u otros huéspedes vertebrados. En forma típica, un diluyente, excipiente, y/o portador aceptables para uso farmacéutico es un diluyente, excipiente, y/o portador aprobados por una agencia regulatoria de un gobierno Federal, estatal, u otra agencia regulatoria, o enumerada en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, que incluye seres humanos así como también mamíferos no humanos. El

término "diluyente, excipiente, y/o portador" se refieren a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra la composición farmacéutica. Tales diluyentes, excipientes, y/o portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, que incluyen las de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético. Se pueden emplear agua, soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como diluyentes, excipientes, y/o portadores líquidos, en particular para soluciones inyectables. Los diluyentes y/o excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de humectantes, agentes de carga, emulsificantes, o agentes de tamponamiento del pH. Estas composiciones pueden adquirir la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, formulaciones de liberación sostenida y similares. Los ejemplos de diluyentes, excipientes, y/o portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. La formulación se debe adecuar al modo de administración. El diluyente, excipiente, y/o portador apropiados serán evidentes para aquellos con experiencia en la técnica y dependerá en gran parte de la vía de administración.

Una respuesta inmune "protectora" se refiere a la capacidad de una composición inmunogénica para obtener una respuesta inmune, ya sea humoral o mediada por células, que sirve para proteger al sujeto de una infección. La protección proporcionada no necesita ser absoluta, es decir, la infección no necesita prevenirse o erradicarse en forma total, si existe una mejora estadísticamente significativa en comparación con una población de sujetos de control, *por ej.* animales infectados no administrados con la vacuna o composición inmunogénica. La protección se puede limitar a la mitigación de la severidad o rapidez del inicio de los síntomas de la infección. Por lo general, una " respuesta inmune protectora" incluiría la inducción de un aumento en los niveles de anticuerpos específicos para un antígeno particular en al menos 50% de los sujetos, que incluye algún nivel de respuestas de anticuerpos funcionales mensurables para cada antígeno. En situaciones particular, una "respuesta inmune protectora " podría incluir la inducción de un aumento en dos veces en los niveles de anticuerpos o un aumento en cuatro veces en los niveles de anticuerpos específicos para un antígeno particular en al menos 50% de los sujetos, que incluye algún nivel de respuestas de anticuerpos funcionales mensurables para cada

antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos opsonizantes se correlacionan con una respuesta inmune protectora. Por lo tanto, la respuesta inmune protectora se puede ensayar por medio de la medición de la disminución porcentual en el recuento bacteriano en un ensayo de la actividad bactericida en suero (SBA) o un ensayo de opsonofagocitosis, por ejemplo aquellos que se describen a continuación. Tales ensayos también son conocidos en la técnica. Para vacunas meningocócicas, por ejemplo, el ensayo de SBA es un sustituto establecido para la protección. En algunas realizaciones, existe una disminución en el recuento bacteriano de al menos 10%, 25%, 50%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más, en comparación con el recuento bacteriano en ausencia de la composición inmunogénica.

Los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" se refieren a un polímero de residuos de aminoácidos y no están limitados a una longitud mínima del producto. Por lo tanto, los péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros, y similares, están incluidos dentro de la definición. Tanto las proteínas de longitud completa como los fragmentos de las mismas están abarcadas por la definición. Los términos también incluyen modificaciones, tales como supresiones, adiciones y sustituciones (por lo general son conservativas por naturaleza, pero pueden ser no conservativas), a una secuencia nativa, con preferencia de manera tal que la proteína mantiene la capacidad para obtener una respuesta inmunológica dentro de un animal al cual se administra la proteína. También se incluyen modificaciones posteriores a la expresión, *por ej.* glicosilación, acetilación, lipidación, fosforilación y similares.

Las variantes activas y fragmentos de los polinucleótidos y polipéptidos revelados también se describen en la presente. Las "variantes" se refieren a secuencias sustancialmente similares. De acuerdo con lo utilizado en la presente, un "polipéptido variante" se refiere a un polipéptido derivado de la proteína nativa por medio de una modificación de uno o más aminoácidos en el extremo N-terminal y/o C-terminal de la proteína nativa. La modificación puede incluir la supresión (denominada truncamiento) de uno o más aminoácidos en el extremo N-terminal y/o C-terminal de la proteína nativa; supresión y/o adición de uno o más aminoácidos en uno o más sitios internos en la proteína nativa; o sustitución de uno o más aminoácidos en uno o más sitios en la proteína nativa. Los polipéptidos variantes continúan hasta poseer la actividad biológica deseada del polipéptido nativo, esto es, son inmunogénicos. Una variante de una secuencia de polipéptido o polunucleótido revelada en la presente (es decir, las SEQ ID NOs: 1 a 25 o 39) en forma típica tendrán al menos aproximadamente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98%, 99% o más identidad de secuencia con la secuencia de referencia.

El término "fragmento" se refiere a una porción de un aminoácido o secuencia de nucleótidos que comprende un número especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos contiguos. En realizaciones particulares, un fragmento de un polipéptido revelado en la presente puede retener la actividad biológica del polipéptido de longitud completa y de ese modo ser inmunogénicos. Los fragmentos de un polunucleótido pueden codificar fragmentos de proteína que retienen la actividad biológica de la proteína y de ese modo son inmunogénicos. En forma alternativa, los fragmentos de un polunucleótido que son útiles como cebadores PCR por lo general no retienen actividad biológica. Por lo tanto, los fragmentos de una secuencia de nucleótidos revelada en la presente puede oscilar entre al menos aproximadamente 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, o 1500 nucleótidos contiguos o hasta el polunucleótido de longitud completa. Los fragmentos de una secuencia de polipéptido revelada en la presente pueden comprender al menos 10, 15, 20, 25, 30, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 400, 425, 450, 475, o 500 aminoácidos contiguos, o hasta el número total de aminoácidos presentes en el polipéptido de longitud completa.

El término "recombinante" de acuerdo con lo utilizado en la presente se refiere a cualquier proteína, polipéptido, o célula que expresa un gen de interés que está producido por medio de métodos de manipulación genética. El término "recombinante" de acuerdo con lo utilizado con respecto a una proteína o polipéptido, significa un polipéptido producido por medio de la expresión de un polinucleótido recombinante. Las proteínas de la presente invención pueden estar aisladas de una fuente natural o producidas por medio de métodos de manipulación genética. "Recombinante", de acuerdo con lo utilizado en la presente, además describe una molécula de ácido nucleico, que, en virtud de su origen o manipulación, no está asociada con toda o una porción del polinucleótido con el que está asociada en la naturaleza. El término "recombinante" de acuerdo con lo utilizado con respecto a una célula huésped significa una célula huésped que incluye un polinucleótido recombinante.

El término "sujeto" se refiere a un mamífero, ave, pez, reptil, o cualquier otro animal. El término "sujeto" también incluye seres humanos. El término "sujeto" también incluye animales domésticos. Los ejemplos no limitantes de animales domésticos incluyen: perros, gatos, cerdos, conejos, ratas, ratones, jerbos, hámsteres, cobayos, hurones, aves, serpientes, lagartos, peces, tortugas y ranas. El término "sujeto"

también incluye animales de ganado. Los ejemplos no limitantes de animales de ganado incluyen: alpacas, bisontes, camellos, bovinos, ciervos, cerdos, caballos, llamas, mulas, burros, ovejas, cabras, conejos, renos, yaks, gallinas, gansos, y pavos.

El término “mamíferos” de acuerdo con lo utilizado en la presente se refiere a cualquier mamífero, tal como, por ejemplo, seres humanos, ratones, conejos, primates no humanos. En una realización preferida, el mamífero es un ser humano.

Los términos "vacuna" o "composición de vacuna”, que se utilizan en forma intercambiable, se refieren a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos una composición inmunogénica que induce una respuesta inmune en un sujeto.

Descripción General

La presente invención también identifica dificultades previamente no identificadas que expresan las variantes P2086 no lipidadas y proporciona métodos para superar estas dificultades y composiciones novedosas de las mismas. Si bien los constructos de plásmidos que codifican variantes P2086 no lipidadas proporcionaban una expresión fuerte de las variantes no lipidadas, estas variantes estaban piruviladas en la Cys N-terminal. La piruvilación previene o reduce la probabilidad de consistencia o uniformidad de elaboración de los polipéptidos. Los inventores además hallaron que la supresión de la Cys N-terminal de las secuencias de variantes P2086 no lipidadas evitaba la piruvilación de las variantes P2086 no lipidadas. Los intentos por superar la piruvilación por medio de la supresión del codón para la Cys N-terminal ya sea derogaban la expresión o daban lugar a la expresión de variantes insolubles. En forma alternativa, la eliminación de la Cys N-terminal de las variantes P2086 no lipidadas disminuyó la expresión en algunas variantes. Sin embargo, en forma sorprendente, los inventores descubrieron que al menos las variantes A05, A12, A22, A62, B01, B09, B22, y B44 no piruviladas y no lipidadas se pueden expresar independientemente de la supresión del residuo de Cys N-terminal. Por lo general, estos polipéptidos se podrían expresar sin modificaciones adicionales distintas a la supresión de Cys, en comparación con la secuencia no lipidada de tipo salvaje correspondiente. Véanse, por ejemplo, los Ejemplos 2 y 4. Además, los inventores descubrieron que las variantes no piruviladas y no lipidadas eran sorprendentemente inmunogénicas y obtenían inesperadamente anticuerpos bactericidas.

Por consiguiente, la presente invención proporciona dos métodos para superar o reducir la probabilidad de estas dificultades en la expresión de variantes no lipidadas. Sin embargo, están contemplados métodos adicionales por la presente

invención. El primer método fuer variar la longitud del tallo de Gly/Ser en la cola de la N-terminal, inmediatamente corriente abajo de la Cys N-terminal. El segundo método fue la optimización de codones dentro de la cola de la N terminal. Sin embargo, la optimización de codones adicionales está contemplada por la presente invención. Estos métodos proporcionan una expresión potenciada de las variantes P2086 solubles no lipidadas. Por ejemplo, en una realización, la expresión potenciada de variantes P2086 solubles no lipidadas se compara con la expresión de las variantes no lipidadas de tipo salvaje correspondientes.

Polipéptidos aislados

En forma sorprendente, los inventores descubrieron polipéptidos ORF2086 aislados no piruvilados, no lipidados. Los inventores además descubrieron que los polipéptidos son inesperadamente inmunogénicos y son capaces de obtener una respuesta inmune bactericida.

De acuerdo con lo utilizado en la presente, el término “no piruvilado” se refiere a un polipéptido que no tiene contenido de piruvato. Los polipéptidos ORF2086 no lipidados que tienen un contenido de piruvato en forma típica exhibieron un cambio de masa de +70, en comparación con el polipéptido de tipo salvaje correspondiente. En una realización, el polipéptido inventivo no exhibe un cambio de masa de +70 en comparación con el polipéptido no lipidado de tipo salvaje correspondiente cuando se mide por medio de espectrometría de masas. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 10.

En otra realización, el polipéptido ORF2086 aislado no lipidado y no piruvilado incluye una supresión de un residuo de cisteína N-terminal comparado con el polipéptido ORF2086 no lipidado de tipo salvaje correspondiente. El término “cisteína N-terminal” se refiere a una cisteína (Cys) en la N-terminal o cola de la N terminal de un polipéptido. En forma más específica, la “cisteína N-terminal” de acuerdo con lo utilizado en la presente se refiere a la cisteína N-terminal en la cual las lipoproteínas LP2086 están lipidadas con una cola de lípido tripalmitoil, de acuerdo con lo conocido en la técnica. Por ejemplo, cuando se refiere a cualquiera de las SEQ ID NOs: 12 a 21 como una secuencia de referencia, la cisteína N-terminal está ubicada en la posición 1. Como otro ejemplo, cuando se refiere a la SEQ ID NO: 70 como una secuencia de referencia, la cisteína N-terminal está ubicada en la posición 1.

El término “polipéptido ORF2086 no lipidado de tipo salvaje” o “polipéptido 2086 no lipidado de tipo salvaje” o “polipéptido no lipidado de tipo salvaje” de acuerdo con lo utilizado en la presente se refiere a un polipéptido ORF2086 que tiene una

secuencia de aminoácido que es idéntica a la secuencia de aminoácido del polipéptido ORF2086 lipidado maduro correspondiente que se halla en la naturaleza. La única diferencia entre las moléculas no lipidadas y las lipidadas es que el polipéptido ORF2086 no lipidado de tipo salvaje no está lipidado con una cola de lípido tripalmitoil en la cisteína N-terminal.

De acuerdo con lo conocido en la técnica, la forma 2086 no lipidado se produce por medio de una proteína que carece de la secuencia líder original o por medio de una secuencia líder que está reemplazada por una porción de secuencia que no especifica un sitio de acilación de ácidos grasos en una célula huésped. Véase, por ejemplo, WO2003/063766, que se incorpora como referencia en su totalidad en la presente.

Los ejemplos de un ORF2086 no lipidado incluyen no únicamente un polipéptido ORF2086 no lipidado de tipo salvaje recién descripto sino también polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácido de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NOs: 12 a 21 donde la Cys N-terminal está suprimida y polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácido de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NOs: 12 a 21 donde la Cys N-terminal está sustituida con un aminoácido que no es un residuo de Cys. Otro ejemplo de un polipéptido ORF2086 no lipidado incluye un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 70 donde la Cys N-terminal está suprimida y un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 70 donde la Cys N-terminal está sustituida con un aminoácido que no es un residuo de Cys. Los ejemplos adicionales de un polipéptido ORF2086 no lipidado incluyen las secuencias de aminoácido seleccionadas de la SEQ ID NO: 44 (B44), la SEQ ID NO: 49 (B09), la SEQ ID NO: 55 (A05), la SEQ ID NO: 57 (B01), la SEQ ID NO: 58 (B01), la SEQ ID NO: 62 (B22), la SEQ ID NO: 64 (A22), y la SEQ ID NO: 75 (B22). Los ejemplos aún adicionales de un polipéptido ORF2086 no lipidado incluyen las secuencias de aminoácidos seleccionadas de la SEQ ID NO: 66 (A12), la SEQ ID NO: 68 (A22), y la SEQ ID NO: 71 (A62). Más ejemplos incluyen la SEQ ID NO: 80 (B24) y la SEQ ID NO: 81 (B24). Los ejemplos adicionales de un polipéptido ORF2086 no lipidado incluyen las secuencias de aminoácidos establecidas en la SEQ ID NO: 76 y la SEQ ID NO: 77. En una realización, el polipéptido no lipidado incluye la secuencia de aminoácido que es al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una secuencia que codifica el polipéptido no lipidado correspondiente. Por ejemplo, en una

realización representativa, el polipéptido A62 no lipidado incluye la secuencia de aminoácido que es al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a la SEQ ID NO: 71.

Los ejemplos de un polipéptido ORF2086 no lipidado de tipo salvaje incluyen polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácido de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NOs: 12 a 21, mostrada en la Figura 2, la SEQ ID NO: 58, la SEQ ID NO: 59, y la SEQ ID NO: 60. Otro ejemplo de un polipéptido ORF2086 no lipidado de tipo salvaje incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido de acuerdo con la SEQ ID NO: 70. Estos polipéptidos ORF2086 no lipidados de tipo salvaje representativos incluyen una Cys N-terminal.

De acuerdo con lo utilizado en la presente, por ejemplo, un polipéptido B44 “no lipidado” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido seleccionada de la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 21 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida, y la SEQ ID NO: 44. Un polipéptido B44 “no lipidado de tipo salvaje” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 21. Un polipéptido B44 “no piruvilado y no lipidado” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido seleccionada de la SEQ ID NO: 21 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida, y la SEQ ID NO: 44.

Como otro ejemplo, de acuerdo con lo utilizado en la presente, un polipéptido B09 “no lipidado” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido seleccionada de la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 18 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida, la SEQ ID NO: 49, y la SEQ ID NO: 50. Un polipéptido B09 “no lipidado de tipo salvaje” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 18. Un polipéptido B09 “no piruvilado y no lipidado” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido seleccionada de la SEQ ID NO: 18 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida, la SEQ ID NO: 49, y la SEQ ID NO: 50.

Aún como un ejemplo adicional, de acuerdo con lo utilizado en la presente, un polipéptido A05 “no lipidado” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido seleccionada de la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 13 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida, y la SEQ ID NO: 55. Otro ejemplo de un polipéptido A05 “no lipidado” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido seleccionada de la SEQ ID NO: 13 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está sustituida con un aminoácido que no es un residuo de Cys. Un ejemplo

adicional de un polipéptido A05 “no lipidado” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 76. Aún otro ejemplo de un polipéptido A05 “no lipidado” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 77. Un polipéptido A05 “no lipidado de tipo salvaje” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 13. Un polipéptido A05 “no piruvilado y no lipidado” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido seleccionada de la SEQ ID NO: 13 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida y la SEQ ID NO: 55. Los ejemplos adicionales de un A05 “no piruvilado y no lipidado” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido seleccionada de la SEQ ID NO: 13 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está sustituida con un aminoácido que no es un residuo de Cys; la SEQ ID NO: 76 donde la Cys en la posición 1 está suprimida; la SEQ ID NO: 76 donde la Cys en la posición 1 está sustituida con un aminoácido que no es un residuo de Cys; y la SEQ ID NO: 77.

De acuerdo con lo utilizado en la presente, un polipéptido A62 “no lipidado” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido seleccionada de la SEQ ID NO: 70, la SEQ ID NO: 70 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida, y la SEQ ID NO: 71. Otro ejemplo de un polipéptido A62 no lipidado incluye un polipéptido que tiene la SEQ ID NO: 70 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está sustituida con un aminoácido que no es un residuo de Cys. Un polipéptido A62 “no lipidado de tipo salvaje” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 70. Un polipéptido A62 “no piruvilado y no lipidado” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido seleccionada de la SEQ ID NO: 70 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida, y la SEQ ID NO: 71. Otro ejemplo de un polipéptido A62 no piruvilado y no lipidado incluye un polipéptido que tiene la SEQ ID NO: 70 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está sustituida con un aminoácido que no es un residuo de Cys. Con preferencia, un polipéptido A62 “no piruvilado y no lipidado” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 71.

De acuerdo con lo utilizado en la presente, un polipéptido A12 “no lipidado” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido seleccionada de la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 14 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida, y la SEQ ID NO: 66. Un polipéptido A12 “no lipidado de tipo salvaje” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 14. Un polipéptido A12 “no piruvilado y no lipidado” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de

aminoácido seleccionada de la SEQ ID NO: 14 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida, y la SEQ ID NO: 66.

De acuerdo con lo utilizado en la presente, un polipéptido A22 “no lipidado” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido seleccionada de la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 15 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida, la SEQ ID NO: 64, y la SEQ ID NO: 68. Un polipéptido A22 “no lipidado de tipo salvaje” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 15. Un polipéptido A22 “no piruvilado y no lipidado” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido seleccionada de la SEQ ID NO: 15 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida, la SEQ ID NO: 64, y la SEQ ID NO: 68. Con preferencia, un polipéptido A22 “no piruvilado y no lipidado” incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 68.

El término “supresión” de la Cys N-terminal de acuerdo con lo utilizado en la presente incluye una mutación que suprime la Cys N-terminal, en comparación con una secuencia de polipéptido no lipidado de tipo salvaje. Por ejemplo, una “supresión” de la Cys N-terminal se refiere a una eliminación del aminoácido Cys de una secuencia de referencia, por ej., de la secuencia de tipo salvaje correspondiente, lo que da lugar a una disminución de un residuo de aminoácido en comparación con la secuencia de referencia. A menos que se describa lo contrario, los términos “Cys N-terminal,” “Cys N-terminal en la posición 1,” “Cys en la posición 1” son intercambiables.

En otra realización, la Cys N-terminal está sustituida con un aminoácido que no es un residuo de Cys. Por ejemplo, en una realización representativa, la Cys N-terminal en la posición 1 de las SEQ ID NOs: 12 a 21 incluye una sustitución C→G en la posición 1. Véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 62 en comparación con la SEQ ID NO: 19 (B22 de tipo salvaje), y la SEQ ID NO: 64 en comparación con la SEQ ID NO: 15 (A22 de tipo salvaje). Los aminoácidos representativos para reemplazar la Cys N-terminal incluyen cualquier aminoácido no Cys, con preferencia un aminoácido polar no cargado tal como, por ejemplo, glicina. En una realización preferida, la sustitución está hecha con un residuo no conservador de Cys.

Los inventores en forma sorprendente descubrieron que la expresión de polipéptidos ORF2086 no lipidado que tienen una supresión de un residuo de Cys N-terminal no dio lugar a piruvilación detectable alguna cuando se midió por medio de espectrometría de masas, en comparación con el polipéptido ORF2086 no lipidado de tipo salvaje correspondiente. Los ejemplos de polipéptidos ORF2086 no piruvilado y no lipidado incluyen aquellos que tienen una secuencia de aminoácido seleccionada del

grupo que consiste en la SEQ ID NO:12 (A04), la SEQ ID NO:13 (A05), la SEQ ID NO:14 (A12), la SEQ ID NO:15 (A22), la SEQ ID NO:16 (B02) , la SEQ ID NO:17 (B03), la SEQ ID NO:18 (B09), la SEQ ID NO:19 (B22), la SEQ ID NO: 20 (B24), la SEQ ID NO: 21 (B44), y la SEQ ID NO: 70 (A62), donde la cisteína en la posición 1 está suprimida. Otro ejemplo de un polipéptido ORF2086 no piruvilado y no lipidado incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 58 (B01), donde la cisteína en la posición 1 está suprimida. Los ejemplos adicionales de polipéptidos ORF2086 aislados no piruvilados y no lipidados incluyen polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 49, la SEQ ID NO: 50, la SEQ ID NO: 55, la SEQ ID NO: 66, la SEQ ID NO: 68, la SEQ ID NO: 71, y la SEQ ID NO: 75. Un ejemplo adicional de un polipéptido ORF2086 no piruvilado y no lipidado incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 57 (B01). Otro ejemplo un polipéptido ORF2086 aislado, no piruvilado y no lipidado incluye un polipéptido que tiene la SEQ ID NO: 77 (A05); un polipéptido que tiene la SEQ ID NO: 76 (A05) donde la Cys en la posición 1 está suprimida; y un polipéptido que tiene la SEQ ID NO: 76 (A05) donde la Cys en la posición 1 está sustituida con un aminoácido que no es un residuo de Cys. Los ejemplos adicionales de polipéptidos ORF2086 no piruvilados y no lipidados incluyen aquellos que tienen una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:12 (A04), la SEQ ID NO:13 (A05), la SEQ ID NO:14 (A12), la SEQ ID NO:15 (A22), la SEQ ID NO: 58 (B01), la SEQ ID NO:16 (B02)¸ la SEQ ID NO:17 (B03), la SEQ ID NO:18 (B09), la SEQ ID NO:19 (B22), la SEQ ID NO: 20 (B24), la SEQ ID NO: 21 (B44), y la SEQ ID NO: 70 (A62) donde la cisteína en la posición 1 está sustituida con un aminoácido que no es un residuo de Cys. Con preferencia, el polipéptido 2086 no piruvilado y no lipidado incluye al menos aproximadamente 250, 255, o 260 aminoácidos consecutivos, y a lo sumo aproximadamente 270, 269, 268, 267, 266, 265, 264, 263, 260, 259, 258, 257, 256, o 255 aminoácidos consecutivos. Se puede combinar cualquier valor mínimo con cualquier valor máximo para definir un intervalo. Con mayor preferencia, el polipéptido tiene al menos 254 o 262 aminoácidos consecutivos. En algunas realizaciones, el polipéptido tiene a lo sumo262 aminoácidos consecutivos. En otras realizaciones, el polipéptido tiene a lo sumo254 aminoácidos consecutivos. En una realización, el polipéptido no piruvilado y no lipidado incluye la secuencia de aminoácido que es al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una secuencia que codifica el polipéptido no piruvilado y no

lipidado correspondiente. Por ejemplo, en una realización representativa, el polipéptido A62 no piruvilado y no lipidado incluye la secuencia de aminoácido que es al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a la SEQ ID NO: 71.

En una realización, el polipéptido ORF2086 aislado no lipidado y no piruvilado está codificado por una secuencia de nucleótido que está vinculada en forma operativa a un sistema de expresión, donde el sistema de expresión es capaz de expresarse en una célula bacteriana. En una realización representativa, la secuencia de nucleótido está vinculada a una secuencia regulatoria que controla la expresión de la secuencia de nucleótido.

Los sistemas de expresión, las secuencias regulatorias, y células bacterianas adecuadas son conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar cualquier vector de expresión de plásmidos, por ej., PET™ (Novogen, Madison Wis.) o PMAL™ (New England Biolabs, Beverly, Mass.) con la condición de que el polipéptido sea capaz de expresarse en una célula bacteriana. Con preferencia, se utiliza el vector PET™ para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. En el sistema PET™, el gen clonada se puede expresar bajo el control de un promotor de fago T7. Las células bacterianas representativas incluyen *Pseudomonas fluorescens*, y con preferencia, *E. coli*.

En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido ORF2086 no lipidado y no piruvilado que se puede obtener por medio del proceso. El polipéptido con preferencia es aislado. La invención además se refiere a composiciones que incluyen un polipéptido ORF2086 no lipidado y no piruvilado que se puede obtener por medio de un proceso. La composición con preferencia es una composición inmunogénica. El proceso incluye la expresión de una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:12, la SEQ ID NO:13, la SEQ ID NO:14, la SEQ ID NO:15, la SEQ ID NO:16¸ SEQ ID NO:17, la SEQ ID NO:18, la SEQ ID NO:19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 58, y la SEQ ID NO: 70, donde la cisteína en la posición 1 está suprimida. En otra realización, el proceso incluye la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 76, donde la cisteína en la posición 1 está suprimida. En una realización adicional, el proceso incluye la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que

consiste en la SEQ ID NO:12, la SEQ ID NO:13, la SEQ ID NO:14, la SEQ ID NO:15, la SEQ ID NO:16¸ la SEQ ID NO:17, la SEQ ID NO:18, la SEQ ID NO:19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 58, y la SEQ ID NO: 70, donde la cisteína en la posición 1 está sustituida con un aminoácido que no es un residuo de Cys. La secuencia de nucleótido está vinculada en forma operativa a un sistema de expresión que es capaz de expresarse en una célula bacteriana.

En una realización, el proceso incluye la expresión de una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 49, la SEQ ID NO: 50, la SEQ ID NO: 55, la SEQ ID NO: 66, la SEQ ID NO: 68, la SEQ ID NO: 71, la SEQ ID NO: 57, y la SEQ ID NO: 75. En otra realización, el proceso incluye la expresión de una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido en la SEQ ID NO: 77. En otra realización, la secuencia de nucleótido está seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 51, la SEQ ID NO: 46, la SEQ ID NO: 47, la SEQ ID NO: 48, la SEQ ID NO: 45, la SEQ ID NO: 54, la SEQ ID NO: 65, la SEQ ID NO: 67, la SEQ ID NO: 69, y la SEQ ID NO: 72. Con preferencia, la célula bacteriana es *E. coli*.

B09, B44, A05: En un aspecto, la invención se refiere a una composición que incluye un primer polipéptido aislado, que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 49 (B09), y un segundo polipéptido aislado, que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 44 (B44). En una realización preferida, los polipéptidos son inmunogénicos. En otra realización preferida, la composición además incluye un polipéptido de la subfamilia ORF2086 del *N. meningitidis* serogrupo B. Con preferencia, el polipéptido de la subfamilia ORF2086 es un polipéptido de la subfamilia A ORF2086 no piruvilado y no lipidado. En una realización representativa, el polipéptido de la subfamilia ORF2086 es A05, los ejemplos de los cuales incluyen, por ejemplo, la SEQ ID NO: 13, donde la cisteína N-terminal en la posición 1 está suprimida, y la SEQ ID NO: 55. En otra realización representativa, la composición incluye un polipéptido A05 no piruvilado y no lipidado que tiene la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 76 donde la Cys en la posición 1 está suprimida; la SEQ ID NO: 76 donde la Cys en la posición 1 está sustituida con un aminoácido que no es un residuo de Cys; y la SEQ ID NO: 77.

Dominios de Polipéptidos

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para producir un polipéptido aislado. El método incluye la expresión en una célula bacteriana de un

polipéptido, que incluye una secuencia que tiene más de 90% de identidad con la SEQ ID NO:21, dicha secuencia incluye al menos un dominio seleccionado del grupo que consiste en los aminoácidos 13 a 18 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 21 a 34 de la SEQ ID NO: 21, y aminoácidos 70 a 80 de la SEQ ID NO: 21, o una combinación de los mismos, donde el polipéptido carece de una cisteína N-terminal. El método además incluye la purificación del polipéptido. El polipéptido producido en el mismo incluye un polipéptido ORF2086 no lipidado y no piruvilado. Con preferencia, el polipéptido es inmunogénico. En una realización preferida, la célula bacteriana es *E. coli.*

Los ejemplos de polipéptidos que incluyen al menos un dominio seleccionado del grupo que consiste en los aminoácidos 13 a 18 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 21 a 34 de la SEQ ID NO: 21, y aminoácidos 70 a 80 de la SEQ ID NO: 21, o una combinación de los mismos, que incluyen la SEQ ID NO: 12 (A04), la SEQ ID NO: 13 (A05), la SEQ ID NO: 14 (A12), la SEQ ID NO: 15 (A22), la SEQ ID NO: 16 (B02), la SEQ ID NO: 17 (B03), la SEQ ID NO: 18 (B09), la SEQ ID NO: 19 (B22), la SEQ ID NO: 20 (B24), y la SEQ ID NO: 21 (B44). Con preferencia, la cisteína en la posición 1 de estos polipéptidos está suprimida. En otra realización, la cisteína en la posición 1 está sustituida con un aminoácido que no es un residuo de Cys. Los polipéptidos representativos adicionales incluyen la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 49, la SEQ ID NO: 50, la SEQ ID NO: 55, la SEQ ID NO: 62, y la SEQ ID NO: 64. Otro polipéptido representativo incluye la SEQ ID NO: 70 y la SEQ ID NO: 71. Un polipéptido representativo adicional incluye la SEQ ID NO: 76. Aún otro polipéptido representativo incluye la SEQ ID NO: 77. Los ejemplos adicionales incluyen SEQ ID NO: 80 (B24) y SEQ ID NO: 81 (B24).

En una realización representativa, la secuencia de polipéptido aislada además incluye al menos un dominio seleccionado del grupo que consiste en los aminoácidos 96 a 116 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos158 a 170 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 172 a 185 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 187 a 199 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 213 a 224 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 226 a 237 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 239 a 248 de la SEQ ID NO: 21, o una combinación de los mismos. Los ejemplos de polipéptidos que incluyen al menos un dominio seleccionado del grupo que consiste en los aminoácidos 13 a 18 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 21 a 34 de la SEQ ID NO: 21, y aminoácidos 70 a 80 de la SEQ ID NO: 21, o una combinación de los mismos, y que además incluye al menos un dominio seleccionado del grupo que consiste en los aminoácidos 96 a 116 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 158 a 170 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 172 a

185 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 187 a 199 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 213 a 224 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 226 a 237 de la SEQ ID NO: 21, los aminoácidos 239 a 248 de la SEQ ID NO: 21, o una combinación de los mismos, que incluyen la SEQ ID NO: 16 (B02), la SEQ ID NO: 17 (B03), la SEQ ID NO: 18 (B09), la SEQ ID NO: 19 (B22), la SEQ ID NO: 20 (B24), y la SEQ ID NO: 21 (B44). Con preferencia, la cisteína en la posición 1 de estos polipéptidos está suprimida. Los polipéptidos representativos adicionales incluyen un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido seleccionada de la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 49, la SEQ ID NO: 50, y la SEQ ID NO: 55, y la SEQ ID NO: 62.

En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido aislado producido por medio de un proceso descripto en la presente. En una realización, el polipéptido aislado es un polipéptido no piruvilado y no lipidado. En otro aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica producida por medio de un proceso descripto en la presente.

Secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos

B09: En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 18 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida o la SEQ ID NO: 49. Las secuencias de nucleótidos representativas que codifican la SEQ ID NO: 49 incluyen las secuencias seleccionadas de la SEQ ID NO: 46, la SEQ ID NO: 47, y la SEQ ID NO: 48. Con preferencia, la secuencia de nucleótido es la SEQ ID NO: 46. En un aspecto, la invención se refiere a una secuencia de nucleótido aislada que incluye la SEQ ID NO: 46. En un aspecto, la invención se refiere a una secuencia de nucleótido aislada que incluye la SEQ ID NO: 47. En un aspecto, la invención se refiere a una secuencia de nucleótido aislada que incluye la SEQ ID NO: 48.

En un aspecto, la invención se refiere a un plásmido que incluye una secuencia de nucleótido seleccionada de la SEQ ID NO: 46, la SEQ ID NO: 47, la SEQ ID NO: 48, y la SEQ ID NO: 45, donde el plásmido es capaz de expresarse en una célula bacteriana. Los sistemas de expresión adecuados, secuencias regulatorias, y células bacterianas son conocidas en la técnica, de acuerdo con lo descripto con anterioridad. Con preferencia, la célula bacteriana es *E. coli*.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 50. En una realización representativa, la SEQ ID NO: 50 está codificada por la SEQ ID NO: 45.

B44: Aún en otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 21 donde la Cys N-terminal está suprimida o la SEQ ID NO: 44. Las secuencias de nucleótidos representativas que codifican la SEQ ID NO: 44 incluyen las secuencias seleccionadas de la SEQ ID NO: 43 y la SEQ ID NO: 51. Con preferencia, la secuencia de nucleótido es la SEQ ID NO: 43. En un aspecto, la invención se refiere a una secuencia de nucleótido aislada que incluye la SEQ ID NO: 43.

A05: En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 13 (A05) donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida o la SEQ ID NO: 55. Las secuencias de nucleótidos representativas que codifican la SEQ ID NO: 55 incluyen las secuencias seleccionadas de la SEQ ID NO: 54, la SEQ ID NO: 65, y la SEQ ID NO: 73. Con preferencia, la secuencia de nucleótido es la SEQ ID NO: 65. En un aspecto, la invención se refiere a una secuencia de nucleótido aislada que incluye la SEQ ID NO: 54. En un aspecto, la invención se refiere a una secuencia de nucleótido aislada que incluye la SEQ ID NO: 65. En un aspecto, la invención se refiere a una secuencia de nucleótido aislada que incluye la SEQ ID NO: 73.

A12: En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 14 (A12) donde la Cys N-terminal está suprimida o la SEQ ID NO: 66. Las secuencias de nucleótidos representativas que codifican la SEQ ID NO: 66 incluyen la SEQ ID NO: 67. En un aspecto, la invención se refiere a una secuencia de nucleótido aislada que incluye la SEQ ID NO: 67.

A22: Aún en otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 15 (A22) donde la Cys N-terminal está suprimida o la SEQ ID NO: 68. Las secuencias de nucleótidos representativas que codifican la SEQ ID NO: 68 incluyen la SEQ ID NO: 69. En un aspecto, la invención se refiere a una secuencia de nucleótido aislada que incluye la SEQ ID NO: 69.

A62: En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene una secuencia de aminoácido que es al menos 95% idéntica a la SEQ ID NO: 71, donde los primeros 20 residuos de aminoácidos de la secuencia no contiene una cisteína. Con preferencia, el polipéptido incluye la secuencia de aminoácido de acuerdo con lo mostrado en las posiciones 1 a 184 de la SEQ ID NO: 71. El polipéptido con preferencia es no lipidado y no piruvilado. En otra realización, el

polipéptido es inmunogénico.

En otra realización, el polipéptido aislado incluye un fragmento de A62. Los fragmentos representativos de A62 incluyen cualquier número de residuos contiguos de la SEQ ID NO: 70 o la SEQ ID NO: 71. En una realización, el polipéptido aislado incluye la secuencia de aminoácido en las posiciones 158 a 185 de la SEQ ID NO: 71. En otra realización, el polipéptido aislado incluye la secuencia de aminoácido en las posiciones 159 a 186 de la SEQ ID NO: 71. En una realización, el polipéptido incluye al menos 6 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácido en las posiciones 185 a 254 de la SEQ ID NO: 71.

En otro aspecto, la invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido aislado que tiene una secuencia de aminoácido que es al menos 95% idéntica a la SEQ ID NO: 71, donde los primeros 20 residuos de aminoácidos de la secuencia no contiene una cisteína. Con preferencia, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 71. En una realización, la secuencia de ácido nucleico aislado incluye la SEQ ID NO: 72.

Aún en otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido aislado que incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 70 (A62) donde la Cys N-terminal está suprimida o la SEQ ID NO: 71. Las secuencias de nucleótidos representativas que codifican la SEQ ID NO: 71 incluyen la SEQ ID NO: 72. En un aspecto, la invención se refiere a una secuencia de nucleótido aislada que incluye la SEQ ID NO: 72.

Composiciones inmunogénicas

En una realización preferida, las composiciones descriptas en la presente que incluyen un polipéptido ORF2086 aislado no lipidado y no piruvilado son inmunogénicas. Las composiciones inmunogénicas que incluyen una proteína codificada por una secuencia de nucleótido de *Neisseria meningitidis* ORF2086 son conocidas en la técnica. Las composiciones inmunogénicas representativas incluyen aquellas que se describen en WO2003/063766, y la publicación solicitud de patente de los Estados Unidos números US 20060257413 y US 20090202593, que se incorporan como referencia en su totalidad en la presente. Tales composiciones inmunogénicas de acuerdo con lo descripto en el mismo incluyen una proteína que exhibe una actividad bactericida identificada como la proteína ORF2086, las porciones inmunogénicas de la misma, y/o equivalentes biológicos de las mismas. La proteína ORF2086 se refiere a una proteína codificada por el marco de lectura abierto 2086 de

la especie *Neisseria*.

La proteína puede ser una proteína recombinante o una proteína aislada de la especie *Neisseria* nativa. Por ejemplo, las proteínas ORF2086 *Neisseria* pueden estar aisladas de cepas bacterianas, tales como las de la especie *Neisseria*, que incluye 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.

Las proteínas ORF2086 incluyen proteínas 2086 de la Subfamilia A y proteínas de la Subfamilia B, porciones inmunogénicas de las mismas, y/o equivalentes biológicos de las mismas. Las proteínas 2086 de la subfamilia A y proteínas 2086 de la subfamilia B son conocidas en la técnica, véase, por ejemplo Fletcher et al., 2004 citado con anterioridad y Murphy et al., *J Infect Dis.* 2009 Aug 1;200(3):379 a 89. Véase también WO2003/063766, que revela las SEQ ID NOs: 260 a 278 en el mismo como secuencias de aminoácido representantes asociadas con las proteínas 2086 de la Subfamilia A. En adición, en WO2003/063766 se revelan las SEQ ID NOS: 279 a 299 en el mismo como secuencias de aminoácido representantes asociadas con las proteínas 2086 de la Subfamilia B. WO2003/063766 se incorpora como referencia en su totalidad en la presente. Las proteínas ORF2086 o equivalentes de las mismas, etc. pueden ser lipidadas o no lipidadas. Con preferencia, la proteína ORF2086 Neisseria es no lipidada. En forma alternativa, las composiciones inmunogénicas pueden ser combinaciones de proteínas ORF2086 lipidadas y no lipidadas.

En una realización, la composición inmunogénica incluye una proteína aislada que tiene al menos 95% de identidad de secuencia de aminoácido con una proteína codificada por una secuencia de nucleótido de *Neisseria* ORF2086. En otra realización, la composición inmunogénica incluye una proteína aislada que tiene al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia de aminoácido idéntica a una proteína codificada por una secuencia de nucleótidos de *Neisseria* ORF2086.

En una realización, la composición inmunogénica incluye una proteína aislada que tiene al menos 95% de identidad de secuencia de aminoácido con una proteína de la Subfamilia A codificada por una secuencia de nucleótido de *Neisseria* ORF2086. Con preferencia, la composición inmunogénica incluye una proteína aislada de la Subfamilia A codificada por una secuencia de nucleótido de *Neisseria* ORF2086. En algunas realizaciones, el polipéptido ORF2086 de la Subfamilia A es una variante A05,

una A04, una A12, una A62, o una A22. En algunas realizaciones, el polipéptido ORF2086 de la Subfamilia A es una variante A05, una A12, o una A22.

Combinación de polipéptidos de la subfamilia A: En una realización, la composición incluye cualquier combinación de polipéptidos ORF2086 de la Subfamilia A. Las combinaciones representativas de polipéptidos ORF2086 de la Subfamilia A incluyen, por ejemplo, A05 y A12; A05 y A22; A05 y A62; A12 y A62; A12 y A22; A22 y A62; A05, A12, y A22; A05, A12, y A62; A12, A22, y A62; y A05, A22, y A62. Con preferencia, el polipéptido ORF2086 de la Subfamilia A es no lipidado y no piruvilado.

En otra realización, la composición inmunogénica incluye una proteína aislada que tiene al menos 95% de identidad de secuencia de aminoácido con una proteína de la subfamilia B codificada por una secuencia de nucleótido de *Neisseria* ORF2086. Con preferencia, la composición inmunogénica incluye una proteína aislada de la subfamilia B codificada por una secuencia de nucleótido de *Neisseria* ORF2086. En algunas realizaciones, la proteína ORF2086 de la subfamilia B es una variante B44, una B02, una B03, una B22, una B24 o una B09. En algunas realizaciones, la proteína ORF2086 de la subfamilia B es una variante B44, una B22, o una B09.

Combinación de polipéptidos de la subfamilia B: En una realización, la composición incluye cualquier combinación de polipéptidos ORF2086 de la subfamilia B. Las combinaciones representativas de polipéptidos ORF2086 de la subfamilia B incluyen, por ejemplo, B09 y B22; B22 y B44; B44 y B09; B01 y B09; B01 y B22; B01 y B44; y B09, B22, y B44; B09 y B24; B22 y B24; B24 y B44; B01 y B24; B02 y B24; B02 y B01; B02 y B09; B02 y B44; B01, B09, y B24; B01, B24, y B44.

En una realización preferida, la composición inmunogénica incluye un polipéptido aislado no piruvilado y no lipidado que tiene al menos 95% de identidad de secuencia de aminoácido con una proteína de la subfamilia B codificada por una secuencia de nucleótido de *Neisseria* ORF2086. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proteína ORF2086 de la subfamilia B es una secuencia seleccionada de una variante B44 que tiene una secuencia de aminoácido de acuerdo con lo mostrado en la SEQ ID NO: 21; una B02 que tiene una secuencia de aminoácido de acuerdo con lo mostrado en la SEQ ID NO: 16; una B03 que tiene una secuencia de aminoácido de acuerdo con lo mostrado en la SEQ ID NO: 17; una B22 que tiene una secuencia de aminoácido de acuerdo con lo mostrado en la SEQ ID NO:19; una B24 que tiene una secuencia de aminoácido de acuerdo con lo mostrado en la SEQ ID NO: 20; una B01 que tiene una secuencia de aminoácido de acuerdo con lo mostrado en la SEQ ID NO: 58; o una B09 que tiene una secuencia de aminoácido de acuerdo con lo

mostrado en la SEQ ID NO:18, donde la Cys N-terminal está suprimida, o una combinación de los mismos.

Con mayor preferencia, la composición inmunogénica incluye un polipéptido B09 no piruvilado y no lipidado, un polipéptido B44 no piruvilado y no lipidado, o combinaciones de los mismos. En una realización, la composición incluye una variante B09 no piruvilada y no lipidada que tiene la secuencia de aminoácido de acuerdo con lo mostrado en la SEQ ID NO:18, donde la Cys N-terminal está suprimida, una B44 no piruvilada y no lipidada que tiene la secuencia de aminoácido de acuerdo con lo mostrado en la SEQ ID NO: 21, donde la Cys N-terminal está suprimida, o una combinación de los mismos. En otra realización, la composición inmunogénica incluye una B09 no piruvilada y no lipidada que tiene la SEQ ID NO: 49, una B44 no piruvilada y no lipidada que tiene la SEQ ID NO: 44, o una combinación de los mismos.

En un aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica que incluye un polipéptido ORF2086 de la subfamilia B de *N. meningitidis* serogrupo B, donde el polipéptido es un B44 no piruvilado y no lipidado. El B44 puede incluir la secuencia de aminoácido de acuerdo con lo mostrado en la SEQ ID NO: 21, donde la Cys N-terminal está suprimida o la SEQ ID NO: 44. En una realización, la composición además incluye un segundo polipéptido ORF2086 de la subfamilia B de *N. meningitidis* serogrupo B, donde el segundo polipéptido es un B09 no piruvilado y no lipidado. El B09 puede incluir la secuencia de aminoácido de acuerdo con lo mostrado en la SEQ ID NO: 18, donde la Cys N-terminal está suprimida, o la SEQ ID NO: 49. En una realización, la composición inmunogénica es una vacuna.

En otra realización, la composición incluye no más de 3 polipéptidos ORF2086 de la subfamilia B. En una realización adicional, la composición incluye no más de 2 polipéptidos ORF2086 de la subfamilia B.

En una realización adicional, la composición incluye a lo sumo 1, 2, o 3 especies de una variante ORF2086 de la subfamilia B. En una realización adicional, la composición incluye a lo sumo 1, 2, o 3 especies de una variante ORF2086 de la subfamilia A.

Composiciones que incluyen un polipéptido de la Subfamilia B y un polipéptido de la Subfamilia A: En una realización, la composición además incluye uno o más polipéptidos ORF2086 de la subfamilia A. En una realización preferida, la composición incluye un polipéptido A05 de la subfamilia A. Con mayor preferencia, el polipéptido A05 de la Subfamilia A es no lipidado y no piruvilado. En otra realización preferida, la composición incluye un polipéptido A62 de la subfamilia A. Con mayor

preferencia, el polipéptido A62 de la Subfamilia A es no lipidado y no piruvilado.

Aún en otra realización, la composición inmunogénica incluye una proteína aislada que tiene al menos 95% de identidad de secuencia de aminoácido con una proteína de la Subfamilia A codificada por una secuencia de nucleótido de *Neisseria* ORF2086, y una proteína aislada que tiene al menos 95% de identidad de secuencia de aminoácido con una proteína de la subfamilia B codificada por una secuencia de nucleótido de *Neisseria* ORF2086.

Con preferencia, la composición inmunogénica incluye una proteína aislada de la Subfamilia A codificada por una secuencia de nucleótido de *Neisseria* ORF2086 y una proteína aislada de la subfamilia B codificada por una secuencia de nucleótido de *Neisseria* ORF2086. Con mayor preferencia, la composición inmunogénica incluye un polipéptido ORF2086 de la Subfamilia A aislado no piruvilado y no lipidado y un polipéptido ORF2086 de la Subfamilia B aislado no piruvilado y no lipidado.

Combinaciones: Se contempla cualquier combinación de polipéptidos ORF2086. En una realización, la composición incluye al menos un polipéptido de la Subfamilia A en ausencia de polipéptidos de la Subfamilia B. Por ejemplo, la composición incluye únicamente polipéptidos de la Subfamilia A. En otra realización, la composición incluye al menos un polipéptido de la Subfamilia B en ausencia de polipéptidos de la Subfamilia A. Por ejemplo, la composición incluye únicamente polipéptidos de la Subfamilia A.

La composición inmunogénica puede incluir cualquier polipéptido de la Subfamilia A o combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el polipéptido ORF2086 de la Subfamilia A es una variante A05, una A04, una A12, o una A22. En otra realización, el polipéptido ORF2086 de la Subfamilia A incluye A62. En una realización preferida, el polipéptido ORF2086 de la Subfamilia A es una variante A05 que tiene una secuencia de aminoácido de acuerdo con lo mostrado en la SEQ ID NO: 13; una A04 que tiene una secuencia de aminoácido de acuerdo con lo mostrado en la SEQ ID NO: 12; una A12 que tiene una secuencia de aminoácido de acuerdo con lo mostrado en la SEQ ID NO: 14; o una A22 que tiene una secuencia de aminoácido de acuerdo con lo mostrado en la SEQ ID NO: 15, donde la Cys N-terminal está suprimida, o cualquier combinación de los mismos. Aún otra composición inmunogénica representativa incluye una combinación de polipéptidos A05 y A62 aislados, no piruvilados y no lipidados ORF2086 de la Subfamilia A. Por ejemplo, la composición inmunogénica puede incluir un polipéptido que tiene la SEQ ID NO: 55 y un polipéptido que tiene la SEQ ID NO: 71. Una composición inmunogénica

representativa adicional incluye una combinación de polipéptidos A05 y A12 aislados, no piruvilados y no lipidados ORF2086 de la Subfamilia A. Otra composición inmunogénica representativa incluye una combinación de polipéptidos A12 y A62 aislados, no piruvilados y no lipidados ORF2086 de la Subfamilia A.

La composición inmunogénica puede incluir cualquier polipéptido de la Subfamilia B o combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la proteína ORF2086 de la subfamilia B es una variante B44, una B02, una B03, una B22, una B24 o una B09. En una realización preferida, la proteína ORF2086 de la subfamilia B es una variante B44 que tiene la secuencia de aminoácido de acuerdo con lo mostrado en la SEQ ID NO: 21; una B02 que tiene una secuencia de aminoácido de acuerdo con lo mostrado en la SEQ ID NO: 16; una B03 que tiene una secuencia de aminoácido de acuerdo con lo mostrado en la SEQ ID NO: 17; una B22 que tiene una secuencia de aminoácido de acuerdo con lo mostrado en la SEQ ID NO:19; una B24 que tiene una secuencia de aminoácido de acuerdo con lo mostrado en la SEQ ID NO: 20; o una B09 que tiene una secuencia de aminoácido de acuerdo con lo mostrado en la SEQ ID NO:18, donde la Cys N-terminal está suprimida, o una combinación de los mismos. Aún otra composición inmunogénica representativa incluye una combinación de polipéptidos B09 y B44 aislados, no piruvilados y no lipidados ORF2086 de la Subfamilia B. Una composición inmunogénica representativa adicional incluye una combinación de polipéptidos B09 y B22 aislados, no piruvilados y no lipidados ORF2086 de la Subfamilia B. Otra composición inmunogénica representativa incluye una combinación de polipéptidos B22 y B44 aislados, no piruvilados y no lipidados ORF2086 de la Subfamilia B. Una composición inmunogénica representativa adicional incluye una combinación de polipéptidos B09, B22 y B44 aislados, no piruvilados y no lipidados ORF2086 de la Subfamilia B.

En una realización, la composición incluye un polipéptido ORF2086 no lipidado en ausencia de un polipéptido ORF2086 lipidado. En otra realización, la composición incluye un polipéptido ORF2086 no lipidado y al menos un polipéptido ORF2086 lipidado.

En una realización, la composición incluye un polipéptido ORF2086 no piruvilado y no lipidado en ausencia de un polipéptido ORF2086 lipidado. En otra realización, la composición incluye un polipéptido ORF2086 lipidado y un polipéptido ORF2086 no piruvilado y no lipidado. Por ejemplo, la composición puede incluir un polipéptido A05 lipidado que tiene la SEQ ID NO: 76 y un A05 no piruvilado y no lipidado que tiene la SEQ ID NO: 77. Otra composición representativa incluye un

polipéptido A05 lipidado que tiene la SEQ ID NO: 76 y un A62 no piruvilado y no lipidado que tiene la SEQ ID NO: 71. Una composición representativa adicional incluye un polipéptido B01 lipidado que tiene la SEQ ID NO: 58 y un A62 no piruvilado y no lipidado que tiene la SEQ ID NO: 71.

Combinaciones representativas: Una composición inmunogénica representativa incluye una combinación de un polipéptidos aislado no lipidado A05, B09, B22, y B44 ORF2086. Por ejemplo, la composición inmunogénica puede incluir un polipéptido ORF2086 de la Subfamilia A A05 no piruvilado y no lipidado (SEQ ID NO: 55) y polipéptidos ORF2086 de la Subfamilia B aislados no piruvilados y no lipidados B09 (SEQ ID NO: 49), B22 (SEQ ID NO: 75), y B44 (SEQ ID NO: 44).

Otra composición inmunogénica representativa incluye una combinación de polipéptidos ORF2086 de la Subfamilia A aislados no piruvilados y no lipidados A05 y A12 y polipéptidos ORF2086 de la Subfamilia B aislados no piruvilados y no lipidados B22 y B44. Una composición inmunogénica representativa adicional incluye polipéptidos A05, A12, B09, y B44 aislados, no piruvilados y no lipidados. Aún otro ejemplo incluye polipéptidos A12, A62, B09, y B44 aislados, no piruvilados y no lipidados. Aún un ejemplo adicional incluye polipéptidos A05, A12, A62, B09, y B44 aislados, no piruvilados y no lipidados. Otra composición inmunogénica representativa incluye polipéptidos A62 y B09 aislados, no piruvilados y no lipidados. Otra composición inmunogénica representativa incluye polipéptidos A62 y B44 aislados, no piruvilados y no lipidados. Otra composición inmunogénica representativa incluye polipéptidos A62, B09, y B44 aislados, no piruvilados y no lipidados. Otra composición inmunogénica representativa incluye polipéptidos A05, A62 y B44 aislados, no piruvilados y no lipidados. Otra composición inmunogénica representativa incluye polipéptidos A05, A62, B09, y B44 aislados, no piruvilados y no lipidados.

En una realización, la composición inmunogénica incluye una proporción 1:1 de una proteína de la subfamilia A a una proteína de la subfamilia B. En otra realización, la composición inmunogénica incluye cualquiera de las siguientes proporciones de un polipéptido de la Subfamilia A a un polipéptido de la Subfamilia B: 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5; 1:6; 1:7; 1:8; 1:9; o 1:10. En otra realización, la composición inmunogénica incluye cualquiera de las siguientes proporciones de un polipéptido de la Subfamilia B a un polipéptido de la Subfamilia A: 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5; 1:6; 1:7; 1:8; 1:9; o 1:10.

Respuestas inmunes bactericidas

En un aspecto, los polipéptidos aislados y composiciones que se describen en

la presente obtienen una respuesta inmune bactericida en un mamífero contra una infección de cualquier serogrupo de *N. meningitidis*, tal como un serogrupo seleccionado del serogrupo A, B, C, E29, H, I, K, L, W-135, X, Y y Z. En una realización preferida, los polipéptidos aislados y composiciones que se describen en la presente obtienen una respuesta inmune bactericida en un mamífero contra una infección de los serogrupos A, B, C, W-135, Y y/o X.

En otro aspecto, los polipéptidos aislados y composiciones descriptas en la presente obtienen una respuesta inmune bactericida en un mamífero contra un polipéptido ORF2086 de *N. meningitidis* serogrupo B. Las composiciones tienen la capacidad de inducir anticuerpos antimeningocócicos bactericidas después de la administración a un mamífero, y en realizaciones preferidas pueden inducir anticuerpos que son bactericidas contra cepas con las respectivas subfamilias. A continuación se presenta información adicional sobre respuestas bactericidas. Véanse, por ejemplo, los Ejemplos 6, 11, 12, y 13.

En una realización, las composiciones obtienen una respuesta inmune bactericida contra una subfamilia heteróloga de *N. meningitidis* serogrupo B. Por ejemplo, una composición que incluye un polipéptido de la Subfamilia A no lipidado puede obtener una respuesta inmune bactericida contra una variante de la subfamilia A de *N. meningitidis* serogrupo B y/o contra una variante de la subfamilia B *N. meningitidis* serogrupo B. Véanse, por ejemplo, los Ejemplos 18 y 19.

En un aspecto adicional, los polipéptidos aislados y composiciones descriptas en la presente obtienen una respuesta inmune bactericida contra al menos una de las cepas del serogrupo A, serogrupo B, serogrupo C, serogrupo W135, y/o serogrupo Y de *N. meningitidis.* En una realización preferida, las composiciones obtienen una respuesta inmune bactericida al menos contra el serogrupo B, serogrupo C, y serogrupo Y de *N. meningitidis*. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 21.

Los anticuerpos bactericidas son un indicador de protección en seres humanos y los estudios preclínicos sirven como un sustituto, y cualquier candidato de composición inmunogénica nueva descripto en la presente debe obtener estos anticuerpos funcionales.

B09: En un aspecto, el polipéptido B09 aislado no lipidado, y las composiciones inmunogénicas del mismo, obtiene anticuerpos bactericidas (por ej., que se pueden unir a) un polipéptido ORF2086 del serogrupo B de *N. meningitidis*, subfamilia B. En una realización representativa, el polipéptido B09 aislado no piruvilado y no lipidado que tiene la SEQ ID NO: 18 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida o

la SEQ ID NO: 49, y las composiciones inmunogénicas del mismo, obtienen anticuerpos bactericidas contra (por ej., que se pueden unir a) un polipéptido ORF2086 del *N. meningitides* serogrupo B, de la subfamilia A o con preferencia de la subfamilia B. Con preferencia, el polipéptido B09 no piruvilado y no lipidado y las composiciones inmunogénicas del mismo, obtienen anticuerpos bactericidas contra la variante A05 (SEQ ID NO: 13); la variante B44 (SEQ ID NO: 21); la variante B16 (SEQ ID NO: 60); la variante B24 (SEQ ID NO: 20); la variante B09 (SEQ ID NO: 18), o una combinación de los mismos. En una realización representativa, el polipéptido B09 no piruvilado y no lipidado y las composiciones inmunogénicas del mismo, obtienen anticuerpos bactericidas contra la variante B44 (SEQ ID NO: 21); la variante B16 (SEQ ID NO: 60); la variante B24 (SEQ ID NO: 20); la variante B09 (SEQ ID NO: 18), o una combinación de los mismos. Véanse, por ejemplo, el Ejemplo 11, el Ejemplo 12, y el Ejemplo 13.

B44: En un aspecto, el polipéptido B44 aislado no lipidado, y las composiciones inmunogénicas del mismo, obtiene anticuerpos bactericidas (por ej., que se pueden unir a) un polipéptido ORF2086 del serogrupo B de *N. meningitidis*, subfamilia B. En otra realización representativa, el polipéptido B44 aislado no piruvilado y no lipidado que tiene la SEQ ID NO: 21 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida o la SEQ ID NO: 44, y las composiciones inmunogénicas del mismo, obtienen anticuerpos bactericidas contra (por ej., que se pueden unir a) un polipéptido ORF2086 del serogrupo B *N. meningitidis*, de la subfamilia B. Con preferencia, el polipéptido B44 no piruvilado y no lipidado y las composiciones inmunogénicas del mismo, obtienen anticuerpos bactericidas contra la variante B44 (SEQ ID NO: 21); la variante B16 (SEQ ID NO: 60); la variante B24 (SEQ ID NO: 20); la variante B09 (SEQ ID NO: 18), o una combinación de los mismos. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 11. En forma adicional, el polipéptido B44 no piruvilado y no lipidado y las composiciones inmunogénicas del mismo también pueden obtener anticuerpos bactericidas que se unen a la variante B02 (SEQ ID NO: 16). Véanse, por ejemplo, el Ejemplo 12 y el Ejemplo 13. Además, el polipéptido B44 no piruvilado y no lipidado y las composiciones inmunogénicas del mismo también pueden obtener anticuerpos bactericidas que se unen a la variante B03 (SEQ ID NO: 17) y la variante B15 (SEQ ID NO: 59). Véase, por ejemplo, el Ejemplo 6.

B22: En un aspecto, el polipéptido B22 aislado no lipidado, y las composiciones inmunogénicas del mismo, obtiene anticuerpos bactericidas contra (por ej., que se pueden unir a) un polipéptido ORF2086 del serogrupo B de *N. meningitidis*, subfamilia B. En una realización representativa adicional, el polipéptido B22 aislado no piruvilado

y no lipidado que tiene la SEQ ID NO: 19 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida, y las composiciones inmunogénicas del mismo, obtienen anticuerpos bactericidas contra (por ej., que se pueden unir a) un polipéptido ORF2086 del serogrupo B *N. meningitidis*, de la subfamilia B. Con preferencia, el polipéptido B22 no piruvilado y no lipidado obtiene anticuerpos bactericidas contra la variante B44 (SEQ ID NO: 21); la variante B16 (SEQ ID NO: 60); la variante B24 (SEQ ID NO: 20); la variante B09 (SEQ ID NO: 18), o una combinación de los mismos. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 13.

A05: En un aspecto, el polipéptido A05 aislado no lipidado, y las composiciones inmunogénicas del mismo, obtiene anticuerpos bactericidas contra (por ej., que se pueden unir a) un polipéptido ORF2086 del serogrupo B de *N. meningitidis*, subfamilia A. En una realización, el polipéptido A05 aislado no piruvilado y no lipidado que tiene la SEQ ID NO: 13 donde la Cys N-terminal está suprimida o la SEQ ID NO: 55, y las composiciones inmunogénicas del mismo, obtienen anticuerpos bactericidas contra (por ej., que se pueden unir a) un polipéptido ORF2086 del serogrupo B *N. meningitidis*, de la subfamilia A. En una realización, el polipéptido A05 aislado incluye la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 76, donde la cisteína en la posición 1 está suprimida. En otra realización, el polipéptido A05 aislado incluye la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 76, donde la cisteína en la posición 1 está sustituida con un aminoácido que no es un residuo de Cys. En una realización, el polipéptido A05 aislado incluye la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 77. Con preferencia, el polipéptido A05 no piruvilado y no lipidado y las composiciones inmunogénicas del mismo, obtienen anticuerpos bactericidas contra la variante A05 (SEQ ID NO: 13), la variante A22 (SEQ ID NO: 15), la variante A12 (SEQ ID NO: 14), o una combinación de los mismos. Véanse, por ejemplo, el Ejemplo 6 y 13.

A62: En un aspecto, el polipéptido A62 aislado no lipidado, y las composiciones inmunogénicas del mismo, obtiene anticuerpos bactericidas contra (por ej., que se pueden unir a) un polipéptido ORF2086 del serogrupo B de *N. meningitidis*, subfamilia A. En una realización, el polipéptido A62 aislado incluye la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 70, donde la cisteína en la posición 1 está sustituida con un aminoácido que no es un residuo de Cys. En otra realización, el polipéptido A62 aislado no piruvilado y no lipidado que tiene la SEQ ID NO: 70 donde la Cys N-terminal está suprimida o la SEQ ID NO: 71, y las composiciones inmunogénicas del mismo, obtienen anticuerpos bactericidas contra (por ej., que se pueden unir a) un polipéptido ORF2086 del serogrupo B *N. meningitidis*, de la subfamilia A y/o la subfamilia B. Por

ejemplo, el polipéptido A62 no piruvilado y no lipidado y las composiciones inmunogénicas del mismo, obtienen anticuerpos bactericidas contra la variante A05 (SEQ ID NO: 13), la variante A12 (SEQ ID NO: 14), la variante A22 (SEQ ID NO: 15), y la variante A62 (SEQ ID NO: 70). Como otro ejemplo, el polipéptido A62 no piruvilado y no lipidado A62 y las composiciones inmunogénicas del mismo, obtienen anticuerpos bactericidas contra la variante A29, la variante B09, y la variante B24. Véanse, por ejemplo, los Ejemplos 18 y 19. En otra realización, el A62 no piruvilado y no lipidado y las composiciones inmunogénicas del mismo, obtiene anticuerpos bactericidas contra la variante B16.

A12: En una realización, el polipéptido A12 aislado no piruvilado y no lipidado que tiene la SEQ ID NO: 14 donde la Cys N-terminal está suprimida o la SEQ ID NO: 66, y las composiciones inmunogénicas del mismo, obtienen anticuerpos bactericidas contra un polipéptido ORF2086 del serogrupo B *N. meningitidis*, de la subfamilia A y/o la subfamilia B. Con preferencia, el polipéptido A12 no piruvilado y no lipidado y las composiciones inmunogénicas del mismo, obtienen anticuerpos bactericidas contra la variante A05 (SEQ ID NO: 13), la variante A22 (SEQ ID NO: 15), la variante A12 (SEQ ID NO: 14), la variante A62 (SEQ ID NO: 70), la variante A29, la variante B09. Véanse, por ejemplo, los Ejemplos 18 y 19.

En una realización, el polipéptido A22 aislado no piruvilado y no lipidado que tiene la SEQ ID NO: 15 donde la Cys N-terminal está suprimida o la SEQ ID NO: 68, y las composiciones inmunogénicas del mismo, obtienen anticuerpos bactericidas contra (por ej., que se pueden unir a) un polipéptido ORF2086 del serogrupo B *N. meningitidis*, de la subfamilia A y/o la subfamilia B. Con preferencia, el polipéptido A22 no piruvilado y no lipidado y las composiciones inmunogénicas del mismo, obtienen anticuerpos bactericidas contra la variante A05 (SEQ ID NO: 13), la variante A22 (SEQ ID NO: 15), la variante A62 (SEQ ID NO: 70), la variante A29. Véanse, por ejemplo, los Ejemplos 18 y 19.

Método para obtener anticuerpos bactericidas

En un aspecto, la invención se refiere a un método para obtener anticuerpos bactericidas específicos para el serogrupo A de *N. meningitidis* en un mamífero. En un aspecto, la invención se refiere a un método para obtener anticuerpos bactericidas específicos para el serogrupo C de *N. meningitidis* en un mamífero. En un aspecto, la invención se refiere a un método para obtener anticuerpos bactericidas específicos para el serogrupo W135 de *N. meningitidis* en un mamífero. En un aspecto, la

invención se refiere a un método para obtener anticuerpos bactericidas específicos para el serogrupo X de *N. meningitidis* en un mamífero. En un aspecto, la invención se refiere a un método para obtener anticuerpos bactericidas específicos para el serogrupo Y de *N. meningitidis* en un mamífero. En un aspecto, la invención se refiere a un método para obtener anticuerpos bactericidas específicos para los serogrupos A, B, C, W-135, X y/o Y de *N. meningitidis* en un mamífero. En un aspecto, la invención se refiere a un método para obtener anticuerpos bactericidas específicos para el serogrupo B *de N. meningitidis* en un mamífero. En una realización representativa, el método incluye obtener anticuerpos bactericidas específicos para un ORF2086 de la subfamilia B de *N. meningitidis* serogrupo B, un ORF2086 de la subfamilia A *N. meningitidis* serogrupo B, o una combinación de los mismos.

El método incluye la administración al mamífero de una cantidad efectiva de un polipéptido 2086 aislado no piruvilado y no lipidado o una composición inmunogénica de los mismos, de acuerdo con lo descripto con anterioridad. Véanse, por ejemplo, los Ejemplos 18, 19, y 22.

En una realización preferida, el método incluye obtener anticuerpos bactericidas específicos para un ORF2086 de la subfamilia B de *N. meningitidis* serogrupo B. El polipéptido aislado o composición inmunogénica incluye un polipéptido B44 no piruvilado y no lipidado. En otra realización preferida, la composición además incluye un polipéptido B09 no piruvilado y no lipidado. En una realización representativa, el polipéptido aislado o composición inmunogénica incluye la SEQ ID NO: 49, la SEQ ID NO: 44, o una combinación de los mismos. En otra realización representativa, el polipéptido aislado o composición inmunogénica incluye la SEQ ID NO: 18, donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida, la SEQ ID NO: 21, donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida, o una combinación de los mismos. Aún en otra realización representativa, el polipéptido aislado o composición inmunogénica incluye la SEQ ID NO: 19, donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida. En una realización, la composición inmunogénica para obtener anticuerpos bactericidas específicos para un ORF2086 de la subfamilia B de *N. meningitidis* serogrupo B incluye al menos uno de un polipéptido A05, A12, y A62 no piruvilados y no lipidados. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 19.

En una realización preferida, el método incluye obtener anticuerpos bactericidas específicos para un ORF2086 de la subfamilia A *N. meningitidis* serogrupo B. El polipéptido aislado o composición inmunogénica incluye un polipéptido A05 no piruvilado y no lipidado. En una realización preferida, el polipéptido aislado o

composición inmunogénica incluye la SEQ ID NO: 13, donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida, En otra realización preferida, la composición además incluye un polipéptido B44 no piruvilado y no lipidado. Véanse, por ejemplo, los Ejemplos 6 y 13. En una realización representativa, el polipéptido aislado o composición inmunogénica incluye la SEQ ID NO: 55, la SEQ ID NO: 44, o una combinación de los mismos. En una realización preferida, el polipéptido aislado o composición inmunogénica incluye la SEQ ID NO: 13, donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida, la SEQ ID NO: 21, donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida, o una combinación de los mismos. En otra realización representativa, el polipéptido aislado o la composición inmunogénica incluye la SEQ ID NO: 77 (A05), la SEQ ID NO: 44 (B44), o una combinación de los mismos. En una realización, la composición inmunogénica para obtener anticuerpos bactericidas específicos para un ORF2086 de la subfamilia A *N. meningitidis* serogrupo B incluye al menos uno de un polipéptido A05, A12, y A62 no piruvilados y no lipidados. Véanse, por ejemplo, los Ejemplos 18 y 19.

Cuando una composición inmunogénica representativa que incluye al menos dos polipéptidos ORF2086 no piruvilados y no lipidados de acuerdo con lo descripto con anterioridad se administró a mamíferos, los inventores en forma sorprendente descubrieron que se puede obtener una respuesta inmune bactericida sinérgica contra el serogrupo B de *Neisseria meningitidis*, en comparación con una composición inmunogénica que incluye un polipéptido ORF2086 no piruvilado y no lipidado respectivo. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 19. Por consiguiente, en una realización, la composición inmunogénica incluye al menos un primer polipéptido ORF2086 no piruvilado y no lipidado que actúa en forma sinérgica con al menos un segundo polipéptido ORF2086 piruvilado y no lipidado para obtener una respuesta inmune contra el serogrupo B de *Neisseria meningitidis*.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para obtener anticuerpos bactericidas específicos para el serogrupo C de N. meningitidis en un mamífero. El método incluye la administración al mamífero de una cantidad efectiva de un polipéptido 2086 aislado no piruvilado y no lipidado de N. meningitidis serogrupo B o una composición inmunogénica de los mismos, de acuerdo con lo descripto con anterioridad. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 22. En una realización, el polipéptido incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 71 o la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la

SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, y la SEQ ID NO: 21, donde la cisteína en la posición 1 está suprimida. Enuna realización, el polipéptido incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 71 o la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20 y la SEQ ID NO: 21, donde la cisteína en la posición 1 está sustituida con un aminoácido que no es un residuo de Cys. En otra realización, la composición inmunogénica además incluye al menos un conjugado seleccionado de: a) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo A, b) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo C, c) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo W135, y d) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo Y. Una composición inmunogénica representativa incluye al menos un polipéptido A62 aislado no piruvilado y no lipidado y a) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo A, b) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo C, c) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo W135, y d) un conjugado de un sacárido capsular de Neisseria meningitidis serogrupo Y.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para obtener anticuerpos bactericidas específicos para el serogrupo Y de *N. meningitidis* en un mamífero. El método incluye la administración al mamífero de una cantidad efectiva de un polipéptido 2086 aislado no piruvilado y no lipidado de *N. meningitidis* serogrupo B o una composición inmunogénica de los mismos, de acuerdo con lo descripto con anterioridad. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 22. En una realización, el polipéptido incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 71 o la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, y la SEQ ID NO: 21, donde la cisteína en la posición 1 está suprimida. En una realización, el polipéptido incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 71 o la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, y la SEQ ID NO: 21, donde la cisteína en la posición 1 está sustituida con un aminoácido que no es un residuo de Cys. En otra realización, la composición inmunogénica adicional incluye al menos un

conjugado seleccionada de: a) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo A, b) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C, c) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo W135, y d) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo Y.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para obtener anticuerpos bactericidas específicos para el serogrupo X de *N. meningitidis* en un mamífero. El método incluye la administración al mamífero de una cantidad efectiva de un polipéptido 2086 no piruvilado y no lipidado de *N. meningitidis* serogrupo B o una composición inmunogénica de los mismos, de acuerdo con lo descripto con anterioridad. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 22. En una realización, el polipéptido incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 71 o la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, y la SEQ ID NO: 21, donde la cisteína en la posición 1 está suprimida. En una realización, el polipéptido incluye la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 71 o la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, y la SEQ ID NO: 21, donde la cisteína en la posición 1 está sustituida con un aminoácido que no es un residuo de Cys. En otra realización, la composición inmunogénica además incluye al menos un conjugado seleccionado de: a) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo A, b) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C, c) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo W135, y d) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo Y.

Cuando una composición inmunogénica representativa que incluye cuatro polipéptidos ORF2086 no piruvilados y no lipidados y un conjugado de un sacárido capsular de cada uno de los *Neisseria meningitidis* serogrupos A, C, W135, e Y de acuerdo con lo descripto con anterioridad se administró a mamíferos, los inventores en forma sorprendente descubrieron que se puede obtener una respuesta inmune bactericida sinérgica al menos contra los serogrupos B, C, e Y de *Neisseria meningitidis*, en comparación con una composición inmunogénica que incluye los polipéptidos ORF2086 donde los conjugados de un sacárido capsular están ausentes,

y en comparación con una composición inmunogénica que incluye un conjugado de un sacárido capsular de cada uno de los *Neisseria meningitidis* serogrupos A, C, W135, e Y donde un polipéptido ORF2086 está ausente. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 22. Por consiguiente, en una realización, la composición inmunogénica incluye al menos un polipéptido ORF2086 no piruvilado y no lipidado que actúa en forma sinérgica con al menos un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo A, C, W135, e Y para obtener una respuesta inmune contra *Neisseria meningitidis*. La respuesta inmune obtenida puede ser contra al menos uno de serogrupos B, C, e Y de *Neisseria meningitidis*. La composición inmunogénica puede incluir una proteína codificada por una secuencia de nucleótido de *Neisseria* ORF2086, polinucleótidos, o equivalentes de los mismos como el único inmunógeno activo en la composición inmunogénica. En forma alternativa, la composición inmunogénica puede incluir en forma adicional inmunógenos activos, que incluye otros polipéptidos inmunogénicos de *Neisseria sp*., o proteínas activas en forma inmunológica de uno o más otros patógenos microbianos (por ej. un virus, prión, bacteria, u hongo, sin limitación) o polisacárido capsular. Las composiciones pueden comprender uno o más proteínas, fragmentos o compuestos farmacéuticos deseados de acuerdo con lo deseado para una indicación elegida.

Cualquier composición inmunogénica multi-antígeno o multivalente está contemplada por la presente invención. Por ejemplo, la composición inmunogénica puede incluir combinaciones de dos o más proteínas ORF2086, una combinación de proteína ORF2086 con uno o más proteínas Por A, una combinación de proteína ORF2086 con polisacáridos de *meningococcus* serogrupo A, C, Y y W135 y/o conjugados de polisacáridos, una combinación de proteína ORF2086 con combinaciones *de meningococcus* y *pneumococcus*, o una combinación de cualquiera de las anteriores en una forma adecuada para una administración deseada, por ej., para administración mucosal. Aquellos con experiencia en la técnica serán capaces con facilidad de formular tales composiciones inmunológicas multi-antígeno o multivalentes.

En un aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica que incluye un polipéptido ORF2086 aislado no lipidado y no piruvilado de *Neisseria meningitidis* serogrupo B, y al menos un conjugado seleccionado de: a) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo A, b) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C, c) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo W135, y d) un conjugado de un

sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo Y.

En una realización, la composición inmunogénica incluye un polipéptido ORF2086 aislado no lipidado y no piruvilado de *Neisseria meningitidis* serogrupo B, y al menos dos de los conjugados. En otra realización, la composición incluye al menos tres de los conjugados. Por ejemplo, las composiciones puede incluir sacáridos de: los serogrupos A y C; los serogrupos A y W135; los serogrupos A e Y; los serogrupos C y W135; los serogrupos W135 e Y; los serogrupos A, C, y W135; los serogrupos A, C, e Y; los serogrupos A, W135, e Y; o los serogrupos C y W135, e Y. Se prefieren las composiciones que incluyen al menos un sacárido del serogrupo C (por ej., C e Y).

Aún en otra realización, la composición inmunogénica incluye un polipéptido ORF2086 aislado no lipidado y no piruvilado de *Neisseria meningitidis* serogrupo B, y cuatro conjugados, por ej., un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo A; un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C; un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo W135; y un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo Y.

En una realización preferida, el conjugado es un conjugado del sacárido capsular y una proteína portadora. Las proteínas portadoras adecuadas son conocidas en la técnica. Con preferencia, la proteína portadora es a toxina bacteriana, tales como una toxina de difteria o tétanos, o toxoides o mutantes de los mismos. Con la mayor de las preferencias, la proteína portadora es CRM_{197}. Por ejemplo, en una realización, la composición incluye al menos un conjugado seleccionado de (a) un conjugado de (i) el sacárido capsular del serogrupo A de *N. meningitidis* y (ii) CRM_{197}; (b) un conjugado de (i) el sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis* y (ii) CRM_{197}; (c) un conjugado de (i) el sacárido capsular del serogrupo W135 de *N. meningitidis* y (ii) CRM_{197}; y (d) un conjugado de (i) el sacárido capsular del serogrupo Y de *N. meningitidis* y (ii) CRM_{197}.

Los sacáridos capsulares de los serogrupos A, C, W135, e Y están caracterizados y son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el sacárido capsular del serogrupo A de meningococo es un homopolímero de N-acetil-D- manosamina-1-fosfato vinculada a (α 1→6), con O-acetilación parcial en las posiciones C3 y C4. La acetilación en la posición C-3 puede ser de 70 a 95%. Las condiciones utilizadas para purificar el sacárido pueden dar lugar a una des-O-acetilación (por ej. bajo condiciones básicas), pero es útil retener OAc en esta posición C-3. En algunas realizaciones, al menos 50% (por ej. al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más) de los residuos de

manosamina en sacáridos del serogrupo A están O-acetilados en la posición C-3. Los grupos acetilo se pueden reemplazar con grupos de bloqueo para prevenir hidrólisis, y tales sacáridos modificados aún son sacáridos del serogrupo A dentro del significado de la invención.

El sacárido capsular del serogrupo C es un homopolímero de ácido siálico vinculado a (α 2→9) (ácido N-acetilneuramínico). La mayor parte de las cepas del serogrupo C tienen grupos O-acetilo en C-7 y/o C-8 de los residuos de ácido siálico, pero algunos aislados clínicos carecen de estos grupos O-acetilo.

El sacárido del serogrupo W135 es un polímero de unidades de disacárido de ácido siálico-galactosa. Al igual que el sacárido del serogrupo C, tiene una O-acetilación variable, pero en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico. La estructura se escribe como: →4)-D-Neu*p*NAc(7/9OAc)-*α*-(2→6)-D-Gal-*α*-(1→.

El sacárido del serogrupo Y es similar al sacárido del serogrupo W135, excepto que la unidad de repetición de disacárido incluye glucosa en lugar de galactosa. La estructura del serogrupo Y se escribe como: →4)-D-Neu*p*NAc(7/9OAc)-*α*-(2→6)-D-Glc-*α*-(1→. Al igual que el serogrupo W135, tiene una O-acetilación variable en las posiciones 7 y 9 del ácido siálico.

Los sacáridos utilizados de acuerdo con la invención pueden estar O-acetilados de acuerdo con lo descripto con anterioridad, por ej., con el mismo patrón de O-acetilación de acuerdo con observado en sacáridos capsulares nativos, o pueden estar des-O-acetilados en forma parcial o total en una o más posiciones de los anillos del sacárido, o pueden estar híper-O-acetilados con relación a los sacáridos capsulares nativos.

En una realización, la composición inmunogénica incluye un polipéptido ORF2086 aislado no lipidado y no piruvilado de *Neisseria meningitidis* serogrupo B, y al menos un conjugado seleccionado de: a) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo A, b) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C, c) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo W135, y d) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo Y, donde el polipéptido ORF2086 no lipidado y no piruvilado incluye al menos uno de los siguientes: B44, B09, A05, B22, A12, A22, A62, B22, B16, B15 y B03. En una realización, el polipéptido incluye la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 49, la SEQ ID NO: 55, la SEQ ID NO: 66, la SEQ ID NO: 68, la SEQ ID NO: 71, y la SEQ ID NO: 75. En otra realización, el polipéptido incluye la secuencia de aminoácido

seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 59, la SEQ ID NO: 60, y la SEQ ID NO: 20, donde la cisteína en la posición 1 está suprimida. En otra realización, el polipéptido incluye la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 59, la SEQ ID NO: 60, y la SEQ ID NO: 20, donde la cisteína en la posición 1 está sustituida con un aminoácido que no es un residuo de Cys.

La presente invención también contempla regímenes de inmunización múltiple donde se puede combinar cualquier composición útil contra un patógeno en las mismas o con las mismas composiciones de la presente invención. Por ejemplo, sin limitación, se puede administrar la composición inmunogénica de la presente invención a un paciente y otra composición inmunológica para inmunizarlo contra el virus del papiloma humano (HPV), tales como la vacuna contra el HPV GARDASIL®, como parte de un régimen de inmunización múltiple. Aquellos con experiencia en la técnica serán capaces con facilidad de seleccionar composiciones inmunogénicas para su uso en conjunto con las composiciones inmunogénicas de la presente invención para los propósitos de desarrollo e implementación de regímenes de inmunización múltiple.

Los polipéptidos ORF2086, fragmentos y equivalentes se pueden utilizar como parte de una composición inmunogénica conjugada; donde una o más proteínas o polipéptidos están conjugadas con un portador con el fin de generar una composición que tiene propiedades inmunogénicas contra varios serotipos, o serotipos de *N. meningitidis*, en forma específica serogrupos meningococos, en forma específica del serogrupo B, y/o contra varias enfermedades. En forma alternativa, uno de los polipéptidos ORF2086 se pueden utilizar como una proteína portadora para otros polipéptidos inmunogénicos. La formulación de tales composiciones inmunogénicas es muy conocida para aquellos con experiencia en este campo.

Las composiciones inmunogénicas de la invención con preferencia incluyen un excipiente, diluyente, y/o portador aceptables para uso farmacéutico. Los excipientes, portadores y/o diluyentes aceptables para uso farmacéutico adecuados incluyen cualquier y todos los solventes convencionales, medios de dispersión, rellenantes, portadores sólidos, soluciones acuosas, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, y similares. Los excipientes, diluyentes, y/o portadores aceptables para uso farmacéutico adecuados incluyen, por ejemplo, uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada de fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como también combinaciones de los mismos.

Los excipientes, diluyentes, y/o portadores aceptables para uso farmacéutico pueden incluir en forma adicional cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsificantes, conservantes o tampones, que potencian la vida útil o efectividad del anticuerpo. La preparación y el uso de excipientes, diluyentes, y/o portadores aceptables para uso farmacéutico son muy conocidos en la técnica. Excepto con la condición de que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el componente activo, está contemplado el uso de los mismos en las composiciones inmunogénicas de la presente invención.

Las composiciones inmunogénicas se pueden administrar por vía parenteral, por ej., por medio de inyección, ya sea por vía subcutánea o intramuscular, así como también por vía oral o intranasal. Los métodos para inmunización por vía intramuscular se describen en Wolff et al. Biotecniques; 11(4):474 a 85, (1991). y en Sedegah et al. PNAS Vol. 91, pp. 9866 a 9870, (1994). 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 sódica, celulosa, carbonato de magnesio, y similares, sin limitación. Con preferencia, la composición inmunogénica se administra por vía intramuscular.

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden comprender además uno o más adicional "inmunomoduladores", que son agentes que perturban o alteran el sistema inmune, de manera tal que ya sea la regulación por aumento o regulación por disminución de humoral y/o inmunidad mediada por células se observa. En una realización particular, se prefiere la regulación por aumento de los brazos humorales y/o mediados por células del sistema inmune. Los ejemplos de ciertos inmunomoduladores incluyen, por ejemplo, un adyuvante o citoquina, o ISCOMATRIX (CSL Limited, Parkville, Australia), descripta en la Patente de los Estados Unidos N.° 5.254.339 entre otras.

Los ejemplos no limitantes de adyuvantes que se pueden utilizar en la vacuna de la presente invención incluyen el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc., Hamilton, Mont.), alum, geles minerales tales como gel de hidróxido de aluminio, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite tales como, *por ej.*, adyuvantes de Freund completos e incompletos, copolímero en bloque (CytRx, Atlanta Ga.), QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.), SAF-M (Chiron, Emeryville Calif.), adyuvante AMPHIGEN®, saponina, Quil A u otra fracción de saponina, monofosforil

lípido A, y adyuvante de lípido-amina avridina. Los ejemplos no limitantes de emulsiones de aceite en agua útiles en la vacuna de la invención incluyen formulaciones de SEAM62 y SEAM 1/2 modificadas. La SEAM62 modificada es una emulsión de aceite en agua que contiene 5% (v/v) de escualeno (Sigma), 1% (v/v) de detergente SPAN® 85 (Tensioactivos ICI), 0,7% (v/v) de detergente polisorbato ® 80 (ICI Tensioactivos), 2,5% (v/v) de etanol, 200 µg/ml de Quil A, 100 µg/ml de colesterol, y 0,5% (v/v) de lecitina. La SEAM 1/2 modificada es una emulsión de aceite en agua que comprende 5% (v/v) de escualeno, 1% (v/v) de detergente SPAN® 85, 0,7% (v/v) de detergente polisorbato 80, 2,5% (v/v) de etanol, 100 µg/ml de Quil A, y 50 µg/ml colesterol.

Otros "inmunomoduladores" que pueden estar incluidos en la vacuna incluyen, *por ej.*, uno o más interleuquinas, interferones, u otras citoquinas o quimiocinas conocidas. En una realización, el adyuvante puede ser un derivado de ciclodextrina o un polímero polianiónico, tal como aquellos que se describen en las Patentes de los Estados Unidos N.° 6.165.995 y 6.610.310, respectivamente. Se ha de comprender que el inmunomodulador y/o adyuvante a utilizarse dependerá del sujeto al cual se administrará la vacuna o composición inmunogénica, la vía de inyección y el número de inyecciones a administrar.

En algunas realizaciones, el adyuvante es saponina. En algunas realizaciones, la concentración de saponina está entre 1 µg/ml y 250 µg/ml; entre 5 µg/ml y 150 µg/ml; o entre 10 µg/ml y 100 µg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de saponina es de aproximadamente 1 µg/ml; aproximadamente 5 µg/ml; aproximadamente 10 µg/ml; aproximadamente 20 µg/ml; aproximadamente 30 µg/ml; aproximadamente 40 µg/ml; aproximadamente 50 µg/ml; aproximadamente 60 µg/ml; aproximadamente 70 µg/ml; aproximadamente 80 µg/ml; aproximadamente 90 µg/ml; aproximadamente 100 µg/ml; aproximadamente 110 µg/ml; aproximadamente 120 µg/ml; aproximadamente 130 µg/ml; aproximadamente 140 µg/ml; aproximadamente 150 µg/ml; aproximadamente 160 µg/ml; aproximadamente 170 µg/ml; aproximadamente 180 µg/ml; aproximadamente 190 µg/ml; aproximadamente 200 µg/ml; aproximadamente 210 µg/ml; aproximadamente 220 µg/ml; aproximadamente 230 µg/ml; aproximadamente 240 µg/ml; o aproximadamente 250 µg/ml.

En ciertas realizaciones preferidas, las proteínas de esta invención se utilizan en una composición inmunogénica para administración oral que incluye un adyuvante mucosal y se utilizan para el tratamiento o prevención de infección por *N. meningitidis* en una huésped humano. El adyuvante mucosal puede ser una toxina de cólera; sin

embargo, con preferencia, los adyuvantes mucosales distintos a una toxina de cólera que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención incluyen derivados non tóxicos de una holotoxina de cólera, donde la subunidad A es una toxina de cólera mutagenizada, químicamente modificada, o proteínas relacionadas que se producen por medio de la modificación de la secuencia de aminoácido de la toxina cólera. Para una toxina de cólera específica que puede ser útil en particular en la preparación de composiciones inmunogénicas de esta invención, véase la holotoxina de cólera mutante E29H, de acuerdo con lo revelado en la Solicitud Internacional Publicada WO 00/18434, que se incorpora como referencia en su totalidad en la presente. Estos se pueden agregar a, o conjugar con, los polipéptidos de esta invención. Se pueden aplicar las mismas técnicas a otras moléculas con adyuvante mucosal o propiedades de administración tales como toxina lábil al calor de Escherichia coli (LT).

Se pueden utilizar otros compuestos con adyuvante mucosal o actividad de administración tales como bilis; policationes tales como DEAE-dextrano y poliornitina; detergentes tales como dodecil bencen sulfato de sodio; materiales conjugados por lípidos; antibióticos tales como estreptomicina; vitamina A; y otros compuestos que alteran la integridad estructural o funcional de las superficies mucosales. Otros compuestos mucosalmente activos incluyen derivados de estructuras microbianas tales como MDP; acridina y cimetidina. STIMULON™ QS-21, MPL, e iL-12, de acuerdo con lo descripto con anterioridad, también se pueden utilizar.

Las composiciones inmunogénicas de esta invención se puede administrar en la forma de ISCOMS (complejos estimuladores inmunes), ISCOMS que contienen CTB, liposomas o encapsulados en compuestos tales como acrilatos o poli(DL-lactida-co- glicosida) para formar microesferas de un tamaño adecuado para la adsorción. Las proteínas de esta invención también se pueden incorporar en emulsiones aceitosas.

Una cantidad (es decir, dosis) de composición inmunogénica que se administra al paciente se puede determinar de acuerdo con técnicas estándar conocidas para aquellos con experiencia ordinaria en la técnica, tomando en consideración tales factores como el antígeno particular, el adyuvante (si está presente), la edad, el sexo, el peso, la especie, la condición del paciente particular, y la vía de administración.

Por ejemplo, una dosificación para un paciente humano adolescente puede incluir al menos 0,1µg, 1 µg, 10 µg, o 50 µg de una proteína ORF2086 de *Neisseria*, y a lo sumo 80 µg, 100 µg, 150 µg, o 200 µg de una proteína ORF2086 de *Neisseria*. Se puede combinar cualquier valor mínimo y cualquier máximo valor para definir un

intervalo adecuado.

Adyuvantes

Las composiciones inmunogénicas de acuerdo con lo descripto en la presente también comprenden, en ciertas realizaciones, uno o más adyuvantes. Un adyuvante es una sustancia que potencia la respuesta inmune cuando se administra junto con un inmunógeno o antígeno. Se ha demostrado que un número de citoquinas o linfocinas tienen actividad moduladora inmune, y por lo tanto son útiles como adyuvantes, que incluyen, pero sin limitación, las interleucinas 1-α, 1-β, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (véase, *por ej.*, la Patente de los Estados Unidos N.° 5.723.127), 13, 14, 15, 16, 17 y 18 (y sus formas mutantes); los interferones-α, β y γ; factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (véase, *por ej.*, la Patente de los Estados Unidos N.° 5.078.996 y ATCC Número de Accesión 39900); factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF); factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF); y los factores de necrosis tumoral α y β.

Incluso otros adyuvantes que son útiles con las composiciones inmunogénicas de acuerdo con lo descripto en la presente incluyen quimiocinas, que incluyen sin limitación, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, y RANTES; moléculas de adhesión, tales como una selectina, *por ej.*, L-selectina, P-selectina y E-selectina; moléculas similares a mucinas, *por ej.*, CD34, GlicAM-1 y MadCAM-1; un miembro de la familia integrina tal como LFA-1, VLA-1, Mac-1 y p150,95; un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas tales como PECAM, ICAM, *por ej.*, ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3, CD2 y LFA-3; moléculas coestimuladoras tales como B7 a 1, B7 a 2,CD40 y CD40L; factores de crecimiento que incluye factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epidérmico, PDGF, BL-1, y factor de crecimiento endotelial vascular; moléculas receptoras que incluye Fas, receptor TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, y DR6; y Caspase (ICE).

Otros adyuvantes representativos incluyen, pero sin limitación hidróxido de aluminio; fosfato de aluminio; STIMULON™ QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Framingham, Mass.); MPL™ (3-O-deacilado monofosforil lípido A; Corixa, Hamilton, Mont.), 529 (un compuesto de fosfato de amino alquil glucosamina, Corixa, Hamilton, Mont.), IL-12 (Genetics Institute, Cambridge, Mass.); GM-CSF (Immunex Corp., Seattle, Wash.); N-acetil-muramil-L-teronil-D-isoglutamina (thr-MDP);

N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, denominada como nor-MDP); N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1′-2 ′-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifos-foriloxi-etilamina) (CGP 19835A, denominada como MTP-PE); y toxina de cólera. En ciertas realizaciones preferidas, el adyuvante es QS-21.

Los adyuvantes representativos adicionales incluyen derivados no tóxicos de toxina de cólera, que incluye su subunidad A, y/o conjugados o fusiones genéticamente manipulada de polipéptido de *N. meningitidis* con toxina de cólera o su subunidad B ("CTB"), procoleragenoide, polisacáridos fúngicos, que incluye esquizofilano, dipéptido de muramilo, derivados de dipéptido de muramilo ("MDP"), ésteres de forbol, la toxina lábil al calor de E. coli, polímeros en bloque o saponinas.

El fosfato de aluminio se ha utilizado como el adyuvante en un ensayo clínico de fase 1 a una concentración de 0,125 mg/dosis, mucho menor que el límite de 0,85 mg/dosis especificado por el US Code of Federal Regulations [610,15(a)]. Los adyuvantes que contienen aluminio se utilizan ampliamente en seres humanos para potenciar la respuesta inmune de antígenos cuando se administran por vía intramuscular o subcutánea. En algunas realizaciones, la concentración de aluminio en la composición inmunogénica está entre 0,125 µg/ml y 0,5 µg/ml; entre 0,20 µg/ml y 0,40 µg/ml; o entre 0,20 µg/ml y 0,30 µg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de aluminio en la composición inmunogénica es de aproximadamente 0,125 µg/ml; aproximadamente 0,15 µg/ml; aproximadamente 0,175 µg/ml; aproximadamente 0,20 µg/ml; aproximadamente 0,225 µg/ml; aproximadamente 0,25 µg/ml; aproximadamente 0,275 µg/ml; aproximadamente 0,30 µg/ml; aproximadamente 0,325 µg/ml; aproximadamente 0,35 µg/ml; aproximadamente 0,375 µg/ml; aproximadamente 0,40 µg/ml; aproximadamente 0,425 µg/ml; aproximadamente 0,45 µg/ml; aproximadamente 0,475 µg/ml; o aproximadamente 0,50 µg/ml.

En una realización preferida, la concentración de aluminio en la composición inmunogénica está entre 0,125 mg/ml y 0,5 mg/ml; entre 0,20 mg/ml y 0,40 mg/ml; o entre 0,20 mg/ml y 0,30 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de aluminio en la composición inmunogénica es de aproximadamente 0,125 mg/ml; aproximadamente 0,15 mg/ml; aproximadamente 0,175 mg/ml; aproximadamente 0,20 mg/ml; aproximadamente 0,225 mg/ml; aproximadamente 0,25 mg/ml; aproximadamente 0,275 mg/ml; aproximadamente 0,30 mg/ml; aproximadamente 0,325 mg/ml; aproximadamente 0,35 mg/ml; aproximadamente 0,375 mg/ml; aproximadamente 0,40 mg/ml; aproximadamente 0,425 mg/ml; aproximadamente 0,45

mg/ml; aproximadamente 0,475 mg/ml; o aproximadamente 0,50 mg/ml.

Los adyuvantes adecuados que se utilizan para potenciar una respuesta inmune además incluyen, sin limitación, MPL™ (3-O-deacilated monofosforil lípido A, Corixa, Hamilton, MT), que se describe en la Patente de los Estados Unidos N.° 4.912.094. Los adyuvantes también adecuados para su uso como adyuvantes son análogos de lípido A sintéticos o compuestos de fosfato de aminoalquil glucosamina (AGP), o derivados o análogos de los mismos, que están disponibles de Corixa (Hamilton, MT), y que se describen en la Patente de los Estados Unidos N.° 6.113.918. Une AGP tal es 2-[(R)-3-Tetradecanoiloxitetradecanoilamino] etil 2-Deoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoioxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxi-tetradecanoil-amino]-b-D-glucopiranosida, que también se conoce como 529 (anteriormente se conocía como RC529). Este adyuvante 529 está formulado como un forma acuosa (AF) o como una emulsión estable (SE).

Incluso otros adyuvantes incluyen péptidos de muramilo, tales como N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanina-2 a (1'-2' dipalmitoil-*sn*-glicero-3 a hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE); emulsiones de aceite en agua, tales como MF59 (Patente de los Estados Unidos N.° 6.299.884) (que contiene 5% de Escualeno, 0,5% de polisorbato 80, y 0,5% de SPAN 85 (que en forma opcional contiene varias cantidades de MTP-PE) formulado en partículas de submicrones que utilizan un microfluidizador tal como el microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA)), y SAF (que contiene 10% de Escualeno, 0,4% de polisorbato 80, 5% de polímero PLURONIC bloqueado L121, y thr-MDP, ya sea microfluidizado en una emulsión de submicrones o vortexado para generar una emulsión de mayor tamaño de partículas mayor); adyuvante de Freund incompleto (IFA); sales de aluminio (alum), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio; AMPHIGEN; Avridina; L121/escualeno; D-lactida-polilactida/glicosida; polioles PLURONIC; *Bordetella* muerta; saponinas, tales como Stimulon™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA.), que se describe en la Patente de los Estados Unidos N.° 5.057.540, ISCOMATRIX (CSL Limited, Parkville, Australia), que se describe en la Patente de los Estados Unidos N.° 5.254.339, y complejos inmunoestimuladores (ISCOMATRIX); *Mycobacterium tuberculosis*; lipopolisacáridos bacterianos; polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen un motivo CpG (*por ej.*, la Patente de los Estados Unidos N.° 6.207.646); IC-31 (Intercell AG, Vienna, Austria), que se describe en las Patentes Europeas N.° 1.296.713 y 1.326.634; una toxina pertussis (PT) o un mutante de la misma, una toxina de cólera o

mutante de la misma (*por ej.*, las Patentes de los Estados Unidos N.° 7.285.281, 7.332.174, 7.361.355 y 7.384.640); o una toxina lábil al calor de *E. coli* (LT) o mutante de la misma, en particular LT-K63, LT-R72 (*por ej.*, las Patentes de los Estados Unidos N.° 6.149.919, 7.115.730 y 7.291.588).

Métodos para Producir Antígenos P2086 No lipidados

En un aspecto, la invención se refiere a un método para producir un polipéptido ORF2086 no piruvilado y no lipidado. El método incluye la expresión de una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido ORF2086 donde la cisteína N-terminal está suprimida en comparación con la secuencia de tipo salvaje correspondiente, y donde la secuencia de nucleótido está vinculada en forma operativa a un sistema de expresión que es capaz de expresarse en una célula bacteriana. Los polipéptidos representativos producidos por el método incluyen cualquier polipéptido descripto en la presente. Por ejemplo, con preferencia, el polipéptido tiene la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 12; la SEQ ID NO: 13; la SEQ ID NO: 14; la SEQ ID NO: 15; la SEQ ID NO: 16; la SEQ ID NO: 17; la SEQ ID NO: 18; la SEQ ID NO: 19; la SEQ ID NO: 20; la SEQ ID NO: 21; la SEQ ID NO: 58; la SEQ ID NO: 70, donde la cisteína en la posición 1 está suprimida, en comparación con la secuencia de tipo salvaje correspondiente. En otra realización preferida, el polipéptido tiene la secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO: 76, donde la cisteína en la posición 1 está suprimida. Los polipéptidos representativos adicionales incluyen un polipéptido que tiene las secuencias de aminoácidos seleccionadas de la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 49, la SEQ ID NO: 50, la SEQ ID NO: 55, la SEQ ID NO: 57, la SEQ ID NO: 62, la SEQ ID NO: 64, la SEQ ID NO: 66, la SEQ ID NO: 68, la SEQ ID NO: 71, y la SEQ ID NO: 75. Un polipéptido representativo adicional incluye un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido en la SEQ ID NO: 77. Otros ejemplos incluyen la SEQ ID NO: 80 (B24) y la SEQ ID NO: 81 (B24). El método además incluye la purificación del polipéptido.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para producir antígenos P2086 solubles no lipidado que comprende los pasos de clonar la secuencia de ácido nucleico de la variante ORF2086 en un vector de expresión de *E. coli* sin una secuencia de control de lipidación, transformar las bacterias de *E. coli* con el vector de expresión de ORF2086, inducir la expresión y aislar la proteína P2086 expresada. En algunas realizaciones, la expresión se induce con IPTG.

En algunas realizaciones, el codón para la Cys N-terminal de la variante

ORF2086 está suprimida. Los ejemplos de tales codones incluyen TGC. En algunas realizaciones, el codón para la Cys N-terminal de la variante ORF2086 está mutada por medio de mutagénesis de punto para generar un codón Ala, Gly, o Val. En algunas realizaciones, se agregan los codones Ser y Gly a la cola de la N terminal de la variante ORF2086 para extender el tallo de Gly/Ser inmediatamente corriente abajo de la Cys N-terminal. En algunas realizaciones, el número total de residuos de Gly y Ser dentro del tallo de Gly/Ser es de al menos 7, 8, 9, 10, 11, o 12. En algunas realizaciones, el codón para la Cys N-terminal está suprimido. En algunas realizaciones, los residuos de la N-terminal 7, 8, 9, 10, 11, o 12 son ya sea Gly o Ser.

En algunas realizaciones, los codones de la cola de la N terminal de la variante ORF2086 no lipidada están optimizados por medio de mutagénesis de punto. En algunas realizaciones, la cola de la N terminal de la variante ORF2086 no lipidada está optimizada para igualar la cola de la N terminal de la variante B09. En algunas realizaciones, los codones de la cola de la N terminal de la variante ORF2086 están optimizados por medio de mutagénesis de punto de manera tal que el codón que codifica el quinto aminoácido de la variante ORF2086 es 100% idéntico a los nucleótidos 13 a 15 de la SEQ ID NO: 8 y el codón que codifica el décimo tercero aminoácido de la variante ORF2086 es 100% idéntico a los nucleótidos 37 a 39 de la SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, la cola de la N terminal de la variante ORF2086 no lipidada está optimizada de manera tal que los 5’ 45 ácidos nucleicos son 100% idénticos a los ácidos nucleicos 1 a 45 de la SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, la cola de la N terminal de la variante ORF2086 no lipidada está optimizada de manera tal que los 5’ 42 ácidos nucleicos son 100% idénticos a los ácidos nucleicos 4 a 45 de la SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, la cola de la N terminal de la variante ORF2086 no lipidada está optimizada de manera tal que los 5’ 39 ácidos nucleicos son 100% idénticos a los ácidos nucleicos 4 a 42 de la SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, la cola de la N terminal de la variante P2086 no lipidada comprende al menos una sustitución de aminoácido en comparación con los aminoácidos 1 a 15 de la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la cola de la N terminal de la variante P2086 no lipidada comprende dos sustituciones de aminoácidos en comparación con los aminoácidos 1 a 15 de la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la cola de la N terminal de la variante P2086 no lipidada comprende al menos una sustitución de aminoácido en comparación con los aminoácidos 2 a 15 de la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la cola de la N terminal de la variante P2086 no lipidada comprende dos sustituciones de aminoácidos en comparación con

los aminoácidos 2 a 15 de la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservativas.

En algunas realizaciones, los codones de la variante no lipidada se han optimizado para una expresión aumentada. La optimización de codones es conocida en la técnica. *Véase, por ej.*, Sastalla et al, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 75(7): 2099 a 2110 (2009) y Coleman et al, *Science*, vol. 320: 1784 (2008). En algunas realizaciones, la optimización de codones incluye igualar la utilización de codones de una secuencia de aminoácido con la frecuencia de codones del organismo huésped elegido mientras que incluye y/o excluye secuencias de ADN específicas. En algunas realizaciones, la optimización de codones además incluye minimizar la estructura de ARNm secundaria correspondiente para reducir los impedimentos traduccionales. En algunas realizaciones, la cola de la N terminal se ha optimizado por codones para comprender cualquiera de las SEQ ID NO: 28, 30, 32, y 34. En algunas realizaciones, el tallo de Gly/Ser se ha optimizado por codones para comprender cualquiera de las SEQ ID NO: 28, 30, 32, y 34.

Con el fin de que esta invención se pueda comprender mejor, se establecen los siguientes ejemplos. Los ejemplos son únicamente para el propósito de ilustración y no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención.

Formulaciones de Composición Inmunogénica

En ciertas realizaciones, las composiciones inmunogénicas de la invención además comprenden al menos uno de un adyuvante, un tampón, un crioprotector, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico, un inhibidor de oxidación de radicales libres, un diluyente o un portador.

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender además uno o más conservantes en adición a una pluralidad de antígenos de proteína meningocócica y conjugados de polisacárido capsular-proteína. La FDA requiere que los productos biológicos en viales de dosis múltiples (multidosis) contienen un conservante, con únicamente unas pocas excepciones. Los productos de vacunas que contienen conservantes incluyen vacunas que contiene cloruro de bencetonio (antrax), 2-fenoxietanol (DTaP, HepA, Lyme, Polio (parenteral)), fenol (Pneumo, Tifoidea (parenteral), Vaccinia) y timerosal (DTaP, DT, Td, HepB, Hib, Influenza, JE, Mening, Pneumo, Rabias). Los conservantes aprobados para su uso en fármacos inyectables incluyen, por ej., clorobutanol, m-cresol, metilparabeno, propilparabeno, 2-fenoxietanol, cloruro de bencetonio, cloruro de benzalconio, ácido benzoico, alcohol bencílico, fenol,

timerosal y nitrato fenilmercúrico.

Las formulaciones de la invención pueden comprender además uno o más de un tampón, una sal, un catión divalente, un detergente no iónico, un crioprotector tal como una azúcar, y un antioxidante tal como un barredor de radicales libres o agente quelante, o cualquier combinación múltiple de los mismos. La elección de cualquier componente, por ej., un quelador, puede determinar si se desea o no otro componente (por ej., un barredor). La composición final formulada para administración de ser estéril y/o libre de pirógenos. Aquellos con experiencia pueden determinar en forma empírica qué combinaciones de estos y otros componentes serán óptimas para su inclusión en las composiciones inmunogénicas de la invención que contienen conservantes dependiendo de una variedad de factores tales como el almacenamiento particular y las condiciones de administración requeridas.

En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más tampones aceptables para uso fisiológico seleccionados de, pero sin limitación, Tris (trimetamina), fosfato, acetato, borato, citrato, glicina, histidina y succinato. En ciertas realizaciones, la formulación se tampona hasta dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,0, con preferencia de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 7,4.

En ciertas realizaciones, puede ser deseable ajustar el pH de la composición o formulación inmunogénica de la invención. El pH de una formulación de la invención se puede ajustar por el uso de técnicas estándares en la técnica. El pH de la formulación se puede ajustar para estar entre 3,0 y 8,0. En ciertas realizaciones, el pH de la formulación puede ser, o se puede ajustar para estar, entre 3,0 y 6,0, 4,0 y 6,0, o 5,0 y 8,0. En otras realizaciones, el pH de la formulación puede ser, o se puede ajustar para ser, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,5, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,8, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,5, o aproximadamente 8,0. En ciertas realizaciones, el pH puede ser, o se puede ajustar para estar, en un intervalo de 4,5 a 7,5, o de 4,5 a 6,5, de 5,0 a 5,4, de 5,4 a 5,5, de 5,5 a 5,6, de 5,6 a 5,7, de 5,7 a 5,8, de 5,8 a 5,9, de 5,9 a 6,0, de 6,0 a 6,1, de 6,1 a 6,2, de 6,2 a 6,3, de 6,3 a 6,5, de 6,5 a 7,0, de 7,0 a 7,5 o de 7,5 a 8,0. En una realización específica, el pH de la formulación es aproximadamente 5,8.

En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible

con administración parenteral comprende uno o más cationes divalentes, que incluye pero sin limitación $MgCl_2$, $CaCl_2$ y $MnCl_2$, a una concentración que oscila entre aproximadamente 0,1 mM y aproximadamente 10 mM, se prefiere hasta aproximadamente 5 mM.

En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende una o más sales, que incluyen pero sin limitación cloruro de sodio, cloruro de potasio cloruro, sulfato de sodio, y sulfato de potasio, que están presentes en una potencia iónica que es aceptable para uso fisiológico para el sujeto tras la administración parenteral y se incluye en la concentración final para producir una fuerza iónica seleccionada u osmolaridad en la formulación final. La fuerza iónica final u osmolalidad de la formulación se determinará por medio de múltiples componentes (por ej., iones de compuesto(s) de tamponamiento y otras sales no de tamponamiento. Una sal preferida, NaCl, está presente en un intervalo de hasta aproximadamente 250 mM, con concentraciones de sal seleccionadas para complementar otros componentes (por ej., azúcares) de manera tal que la osmolaridad total final de la formulación es compatible con la administración parenteral (por ej., inyección intramuscular o subcutánea) y promoverán estabilidad a largo término de los componentes inmunogénicos de la formulación de la composición inmunogénica sobre varios intervalos de temperatura. Las formulaciones libres de sal tolerarán intervalos aumentados de los uno o más crioprotectores seleccionados para mantener los niveles de osmolaridad final deseados.

En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más crioprotectores seleccionados de, pero sin limitación, disacáridos (por ej., lactosa, maltosa, sacarosa o trehalosa) y polihidroxi hidrocarburos (por ej., dulcitol, glicerol, manitol y sorbitol).

En ciertas realizaciones, la osmolaridad de la formulación está en un intervalo de aproximadamente 200 mOs/L a aproximadamente 800 mOs/L, con un intervalo preferido de aproximadamente 250 mOs/L a aproximadamente 500 mOs/L, o de aproximadamente 300 mOs/L a aproximadamente 400 mOs/L. Una formulación libre de sal puede contener, por ejemplo, de aproximadamente 5% a aproximadamente 25% de sacarosa, y con preferencia de aproximadamente 7% a aproximadamente 15%, o aproximadamente 10% a aproximadamente 12% de sacarosa. En forma alternativa, una formulación libre de sal puede contener, por ejemplo, de aproximadamente 3% a aproximadamente 12% de sorbitol, y con preferencia de aproximadamente 4% a 7%, o de aproximadamente 5% a aproximadamente 6% de

sorbitol. Si se agrega una sal tal como cloruro de sodio, entonces el intervalo de sacarosa o sorbitol efectivo disminuye en forma relativa. Estas y otras consideraciones de osmolalidad y osmolaridad son muy conocidas dentro del alcance de la técnica.

En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más inhibidores de oxidación de radicales libres y/o agentes quelantes. Se conoce una variedad de barredores de radicales libres y queladores en la técnica y se aplican a las formulaciones y métodos de uso descriptos en la presente. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, etanol, EDTA, una combinación de EDTA/etanol, trietanolamina, manitol, histidina, glicerol, citrato de sodio, hexafosfato de inositol, tripolifosfato, ácido ascórbico/ascorbato, ácido succínico/succinato, ácido málico/maleato, desferal, EDDHA y DTPA, y varias combinaciones de dos o más de los anteriores. En ciertas realizaciones, se puede agregar al menos un barredor de radicales libres no reductor a una concentración que potencia en forma efectiva la estabilidad a largo término de la formulación. También se pueden agregar uno o más inhibidores de oxidación de radicales libres/queladores en varias combinaciones, tales como un barredor y un catión divalente. La elección del quelador determinará si se necesita o no la adición de un barredor.

En ciertas realizaciones, una formulación de la invención que es compatible con la administración parenteral comprende uno o más tensioactivos no iónicos, que incluyen pero sin limitación ésteres de ácido graso de polioxietilen sorbitano, Polisorbato-80 (TWEEN 80), Polisorbato-60 (TWEEN 60), Polisorbato-40 (TWEEN 40) y Polisorbato-20 (TWEEN 20), polioxietilen alquil éteres, que incluyen pero sin limitación BRIJ 58, BRIJ 35, así como también otros tales como TRITON X-100; TRITON X-114, NP40, SPAN 85 y las series PLURONIC de tensioactivos no iónicos (por ej., PLURONIC 121), siendo los componentes preferidos Polisorbato-80 a una concentración de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 2% (se prefiere hasta aproximadamente 0,25%) o Polisorbato-40 a una concentración de aproximadamente 0,001% a 1% (se prefiere hasta aproximadamente 0,5%).

En ciertas realizaciones, una formulación de la invención comprende uno o más agentes estabilizantes adicionales adecuados para administración parenteral, por ej., un agente reductor que comprende al menos un grupo tiol (-SH) (por ej., cisteína, cisteína N-acetil, glutationa reducida, tioglicolato de sodio, tiosulfato, monotioglicerol, o mezclas de los mismos). En forma alternativa o en forma opcional, las formulaciones de composición inmunogénica de la invención que contienen conservantes se pueden estabilizar en forma adicional por medio de la eliminación del oxígeno de los

contenedores de almacenamiento, la protección de la formulación de la luz (por ej., por el uso de contenedores de vidrio ámbar).

Las formulaciones de composición inmunogénica de la invención que contienen conservantes pueden comprender uno o más diluyentes, portadores o excipientes aceptables para uso farmacéutico, que incluyen cualquier excipiente que no induzca por sí mismo una respuesta inmune. Los excipientes adecuados incluyen pero sin limitación macromoléculas tales como proteínas, sacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido, sacarosa (Paoletti et al, 2001, *Vaccine*, 19:2118), trehalosa, lactosa y agregados de lípidos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Tales diluyentes, excipientes, y/o portadores con muy conocidos para aquellos con experiencia. Los excipientes aceptables para uso farmacéutico se discuten, por ej., en Gennaro, 2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ma edición, ISBN:0683306472.

Las composiciones de la invención pueden estar en una forma liofilizada o acuosa, es decir, soluciones o suspensiones. Las formulaciones líquidas se pueden administrar en forma ventajosa directamente de su forma envasada y de ese modo son ideales para inyección sin la necesidad de reconstitución en un medio acuoso que de lo contrario se requiere para las composiciones de la invención liofilizadas.

La administración directa de las composiciones inmunogénicas de la presente invención a un sujeto se pueden lograr por medio de administración parenteral (por vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intravenosa, o el espacio intersticial de un tejido); o por medio de administración rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, aural, pulmonar u otra administración mucosal. En una realización preferida, la administración parenteral es por medio de inyección intramuscular, por ej., en el muslo o la parte superior del brazo del sujeto. La inyección puede ser por medio de una aguja (por ej., una aguja hipodérmica), pero en forma alternativa se puede utilizar una inyección libre de agujas. Una dosis intramuscular típica es de 0,5ml. Las composiciones de la invención se pueden preparar en varias formas, por ej., para inyección ya sea como soluciones líquidas o suspensiones. En ciertas realizaciones, la composición se puede preparar como un polvo o pulverizador para administración pulmonar, por ej., en un inhalador. En otras realizaciones, la composición se puede preparar como un supositorio o pesario, o para administración nasal, aural u ocular, por ej., como un pulverizador, gotas, gel o polvo.

Las cantidades óptimas de componentes para una composición inmunogénica particular se pueden determinar por medio de estudios estándares que implican la

observación de respuestas inmunes apropiadas en sujetos. Luego de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo separadas en forma adecuada.

Envasado y Formas de Dosificación

Las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden envasar en formas de dosis unitarias o multidosis (por ej. 2 dosis, 4 dosis, o más). Para las formas de multidosis, en forma típica se prefieren viales pero no necesariamente sobre jeringas prellenadas. Los formatos multidosis adecuados incluyen pero sin limitación: 2 a 10 dosis por contenedor a 0,1 a 2 ml por dosis. En ciertas realizaciones, la dosis es una dosis de 0,5 ml. Véase, por ej., la Solicitud de patente Internacional WO2007/127668, que se incorpora como referencia en la presente.

Las composiciones se pueden presentar en viales u otros contenedores de almacenamiento adecuados, o se pueden presentar en dispositivos de administración prellenados, por ej., jeringas de componente único o múltiple, que pueden estar suministradas con o sin agujas. Una jeringa en forma típica contiene, pero no necesariamente requiere contener, una única dosis de la composición inmunogénica de la invención que contiene conservante, si bien también se conciben jeringas multidosis y prellenadas. Asimismo, un vial puede incluir una dosis única pero en forma alternativa incluye dosis múltiples.

Los volúmenes de dosificación efectiva se pueden establecer en forma rutinaria, pero una dosis típica de la composición para inyección tiene un volumen de 0,5 ml. En ciertas realizaciones, la dosis está formulada para la administración a un sujeto humano. En ciertas realizaciones, la dosis está formulada para la administración a un sujeto humano adulto, adolescente, niño o infante (es decir, no más de un año de edad) y en realizaciones preferidas se pueden administrar por medio de inyección.

Las composiciones inmunogénicas de la invención líquidas también son adecuadas para reconstituir otras composiciones inmunogénicas que se presentan en forma liofilizada. Cuando una composición inmunogénica ha de utilizarse para tal reconstitución extemporánea, la invención proporciona un kit con dos o más viales, dos o más jeringas prellenadas, o uno o más de cada uno, los contenidos de la jeringa se utilizan para reconstituir los contenidos del vial antes de la inyección, o vice versa.

En forma alternativa, las composiciones inmunogénicas de la presente invención se pueden liofilizar y reconstituir, por ej., por el uso de uno de una multitud de métodos para liofilización muy conocidos en la técnica para formar partículas

secas, de forma regular (por ej., esféricas), tales como micropélets o microesferas, que tienen características de partículas tales como tamaños de diámetros medios que se pueden seleccionar y controlar por medio de la variación de los métodos exactos que se utilizan para prepararlos. Las composiciones inmunogénicas pueden comprender además un adyuvante que en forma opcional se puede preparar con o contener en partículas separadas secas, de forma regular (por ej., esféricas) tales como micropélets o microesferas. En tales realizaciones, la presente invención además proporciona un kit de una composición inmunogénica que comprende un primer componente que incluye una composición inmunogénica estabilizada y seca, en forma opcional comprende uno o más conservantes de la invención, y un segundo componente que comprende una solución estéril, acuosa para la reconstitución de los primeros componentes. En ciertas realizaciones, la solución acuosa comprende uno o más conservantes, y en forma opcional puede comprender al menos un adyuvante (véase, por ej., WO2009/109550 (que se incorpora en la presente como referencia).

Aún en otra realización, un contenedor del formato multidosis se selecciona de uno o más del grupo que consiste en, pero sin limitación, cristalería de laboratorio general, matraces, vasos de precipitados, cilindros graduados, fermentadores, biorreactores, tuberías, tubos, bolsas, frascos, viales, cierres de viales (por ej., un tapón de goma, una rosca en el tapón), ampollas, jeringas, jeringas de cámara doble o múltiple, tapones de jeringas, pistones de jeringas, cierres de goma, cierres de plástico, cierres de vidrio, cartuchos y plumas desechables y similares. El contenedor de la presente invención no está limitado por el material de elaboración, e incluye materiales tales como vidrio, metales (por ej., acero, acero inoxidable, aluminio, etc.) y polímeros (por ej., termoplásticos, elastómeros, termoplásticos-elastómeros). En una realización particular, el contenedor del formato es un vial de vidrio de 5 ml de Tipo Schott 1 con un tapón de butilo. Aquellos con experiencia apreciarán que el formato establecido con anterioridad de ningún modo es una lista exhaustiva, sino que simplemente sirve como una guía para aquellos con experiencia con respecto a la variedad de formatos disponibles para la presente invención. Los formatos adicionales contemplados para su uso en la presente invención se pueden hallar en catálogos publicados de vendedores y elaboradores de equipamiento de laboratorio tales como United States Plastic Corp. (Lima, OH), VWR.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Procedimientos experimentales

Ensayo bactericida en suero

Se inmunizaron Macacos Cynomolgus (n = 5/grupo) por vía intramuscular con proteínas rLP2086 o rP2086 (A + B) adsorbidas a $AlPO_4$. Los macacos Cynomolgus son un ejemplo de primates no humanos. Los animales se vacunaron en las semanas 0, 4 y 24, y se determinaron titulaciones de anticuerpo funcional de IgG específicas de ORF2086 en las semanas 0, 4, 6 y 26. Se determinaron titulaciones de IgG específicas de ORF2086 en suero contra rLP2086A y B.

Se examinaron titulaciones de anticuerpo funcional por medio de un ensayo bactericida en suero (SBA) contra cepas de *Neisseria meningitidis* que expresaban ya sea LP2086 con secuencias homólogas o heterólogas a aquellas contenidas en la vacuna.

Se determinaron los anticuerpos bactericidas en suero en macacos o conejos inmunizados con la vacuna ORF2086 por el uso de un SBA con complemento humano. Los sueros inmunes de conejos o sueros inmunes de macacos se inactivaron por calor para eliminar la actividad complementaria intrínseca y posteriormente se diluyeron en forma serial 1:2 en PBS de Dulbecco con Ca2+ y Mg2+ (D-PBS) en una placa de microtitulación de 96 pocillos para probar la actividad bactericida en suero contra cepas *de N. meningitidis*. Las bacterias utilizadas en el ensayo se cultivaron en medios GC suplementados con suplemento de Kellogg (GCK) y se monitorearon por medio de densidad óptica a 650 nm. Las bacterias se cosecharon para su uso en el ensayo a un OD_{650} final de 0,50-0,55, se diluyeron en D-PBS y se agregaron 1000 a 3000 CFU a la mezcla de ensayo con 20% de complemento humano.

El suero humano sin actividad bactericida detectable se utilizó como la fuente de complemento exógeno. Las fuentes de complemento se probaron por su adecuabilidad contra cada cepa de prueba individual. Únicamente se utilizó una fuente de complemento si el número de bacterias que sobrevivían en los controles sin sueros inmunes agregados era >75%. Se requirieron diez fuentes de complemento únicas para llevar a cabo los SBA descriptos en este estudio.

Después de una incubación de 30 minutos a 37ºC con 5% de CO_2, se agregó D-PBS a la mezcla de reacción y se transfirieron alícuotas en placas de microfiltros llenadas con 50% de medios GCK. Las placas de microfiltros se filtraron, se incubaron hasta el día siguiente a 37ºC con 5% de CO_2 y se tiñeron microcolonias y se cuantificaron. Las titulaciones bactericidas en suero se definieron como la dilución en suero recíproca interpolada que dio un 50% de reducción en las CFU en comparación con las CFU en los pocillos de control sin sueros inmunes. La titulación SBA se define

como la recíproca de la dilución interpolada del suero de prueba que provoca un 50% de reducción en los recuentos bacterianos después de una incubación de 30 minutos a 37ºC. Se estableció la susceptibilidad a la eliminación con sueros inmunes ORF2086 si había un aumento de 4 veces o más en la titulación SBA para sueros inmunes ORF2086 en comparación con los sueros preinmunes correspondientes. Los sueros que fueron negativos contra la cepa de ensayo en la dilución de inicio se asignaron una titulación de la mitad del límite de detección para el ensayo (es decir, 4).

Ejemplo 2: Clonación y Expresión de Variantes ORF2086 no Lipidadas

La secuencia de aminoácido P2086 maduro correspondiente a los residuos 27 a 286 de *N. meningitidis* cepa M98250771 (A05) se derivaron en forma original de la amplificación de PCR de ADN genómico. El cebador directo, con una secuencia de TGCCATATGAGCAGCGGAAGCGGAAG (SEQ ID NO: 22), se templó con la 5' secuencia y contenían un sitio NdeI para la clonación. El cebador inverso, con una secuencia de CGGATCCCTACTGTTTGCCGGCGATGC (SEQ ID NO: 23), se templó con el 3' extremo del gen y contenía un codón de terminación TAG seguido del sitio de restricción BamHI. El fragmento amplificado 799 bp primero se clonó en un vector intermedio PCR2.1 (Invitrogen, Carlesbac, CA). Este plásmido se escindió con NdeI y BamHI, y se ligó al vector de expresión pET9a (Novagen, Madison, WI) que se había escindido con NdeI y BamHI. El vector pLA100 resultante (que incluye la SEQ ID NO: 54), expresó el P2086 maduro de la Subfamilia A05 de la cepa M98250771 sin la cisteína N-terminal (véase la SEQ ID NO: 13 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida o la SEQ ID NO: 55) que estaría presente en la proteína lipidada. Se utilizó la cepa huésped de *E. coli* BLR(DE3) [F- ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm ∆(srl-recA)306::Tn10 (TetR) (DE3)] (Novagen) para obtener la expresión de fHBP.

Se utilizaron los mismos pasos de clonación para preparar las variantes suprimidas B02, B03, B09, B22, B24, B44, A04, A12, y A22 Cys N-terminales. Las variantes que contienen Cys N-terminales también se prepararon por este mismo método por el uso de cebadores directos que también incluyó el codón Cys (por ej. El primer codón de las SEQ ID NOs: 1 a 11). Con base en las secuencias proporcionadas en la presente, aquellos con experiencia serán capaces de diseñar cebadores directos e inversos para cada una de estas variantes. Por ejemplo, se utilizaron los siguientes cebadores para amplificar la variante B44 no lipidada seguido de la clonación en pET9a por el uso de NdeI y BlpI.

Tabla 1

Cys N-terminal	Secuencia de Cebador	SEQ ID NO
Incluida—Dir	5’ TTTCTTcccgggAAGGAGatatacatatg TGCAGCAGCGGAGGCGGCGG 3’	24
Incluida—Inv	5’ TTTCTTgctcagcaTTATTGC TTGGCGGCAAGACCGAT 3’	25
Suprimida—Dir	5’ TTTCTTcccgggAAGGAGatatacatatg AGCAGCGGAGGCGGCGG 3’	26
Suprimida—Inv	5’ TTTCTTgctcagcaTTATTGC TTGGCGGCAAGACCGAT 3’	27

Resultados

Los constructos de plásmido no lipidado estaban fuertemente expresados, pero las variantes de proteína no lipidadas estaban piruviladas en el residuo de la Cys N-terminal. Véanse los Ejemplos 8 y 9, que describen, por ejemplo, un método para expresar los constructos. Para superar esta piruvilación, el codón de la Cys N-terminal se suprimió. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 10. Sin embargo, la supresión de la Cys N-terminal, derogó la expresión de las variantes A22 y B22. *Véase por ej.*, la Figura 4. Sin embargo, las variantes A05, B01, y B44, aún estaban expresadas independientemente de la supresión del residuo de la Cys N-terminal. Véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 13 (A05), donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida, la SEQ ID NO: 35 (B01 N-terminal), y la SEQ ID NO: 21(B44), donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida. *Véase por ej.*, la Figura 5. En adición, la expresión de la variante B09 no lipidada no se vio afectada por la supresión del residuo de la Cys N-terminal. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 4.

Ejemplo 3: Efecto del Tallo de Gly/Ser en Expresión de Variante no lipidada

Para determinar por qué las variantes A05, B01, y B44 se expresaban en la ausencia de la Cys N-terminal y las variantes A22 y B22 no, las secuencias de estas variantes se alinearon. Las variantes A05, B01, y B44 todas poseen una serie extendida de 10 o 11 residuos de Gly y Ser inmediatamente luego de la Cys N-terminal (es decir, el tallo de Gly/Ser). Sin embargo, las variantes A22 y B22, únicamente tenían un tallo de Gly/Ser que consistía en 6 residuos de Gly y Ser. Por consiguiente, el tallo de Gly/Ser de las variantes A22 y B22 se expandió por medio de la inserción de residuos Gly y Ser adicionales.

Se prepararon variantes de tallo de Gly/Ser largos por medio de los métodos que se describen en el Ejemplo 2 por el uso de cebadores directos que codifican un tallo de Gly/Ser ya sea 10 o 11 residuos de Gly y Ser.

Las variantes A22 y B22 con una Cys N-terminal suprimida, de tallo de Gly/Ser largo (10 a 11 residuos de Gly/Ser) mostró una expresión aumentada sobre las variantes A22 y B22 en una Cys N-terminal suprimida, de tallo de Gly/Ser corto (6 residuos de Gly/Ser). Sin embargo, estos niveles de expresión aún eran reducidos en comparación con los niveles de expresión de las variantes A05, B01, y B44.

Ejemplo 4: Optimización de codones

La expresión de la variante B09 no lipidada no se vio afectada por la supresión del residuo de la Cys N-terminal (véase la SEQ ID NO: 18, donde la cisteína en la posición 1 está suprimida, o la SEQ ID NO: 49). *Véase, por ej.*, la Figura 6. La evaluación de secuencia de la variante B09 demostró que la variante B09 tiene un tallo de Gly/Ser que consiste en 6 residuos de Gly y Ser, similar al tallo de Gly/Ser de las variantes A22 y B22. De hecho, las colas de la N terminal de las variantes B09 y A22 son idénticas en cuanto al nivel de aminoácido. Sin embargo, las colas de la N terminal de las variantes B09 y A22 (SEQ ID NO: 53 y 42, respectivamente), varían en cuanto al nivel de ácido nucleico por 2 ácidos nucleicos: los ácidos nucleicos 15 y 39 de la SEQ ID NO: 8. *Véase por ej.*, la Figura 6. Los primeros 14 aminoácidos de la cola de la N terminal de la variante B22 son idénticos a las variantes B09 y A22, y la cola de la N terminal de la variante B22 únicamente difiere en el 15vo aminoácido. Los ácidos nucleicos 1 a 42 de la variante B22 son idénticos a los ácidos nucleicos 1 a 42 de la variante A22. Los ácidos nucleicos 1 a 42 de la variante B22 (véase la SEQ ID NO: 52) son idénticos a los ácidos nucleicos 1 a 42 de la variante B09 (véase la SEQ ID NO: 53) pero por diferencias en los ácidos nucleicos 15 y 39, cuando están alineados en forma óptima. Por consiguiente, la variante B22 difiere de la variante B09 en los aminoácidos 15 y 39 de la SEQ ID NO: 8. Esta última oración contiene un error tipográfico y debería declarar que la variante B22 difiere de la variante B09 en los ácidos nucleicos 15 y 39 de la SEQ ID NO: 8.

Para determinar si las diferencias del ácido nucleico afectaron el nivel de expresión de la variante B09 en comparación con las variantes A22 y B22, las variantes A22 y B22 se mutaron por medio de mutación por punto para incorporar los ácidos nucleicos 15 y 39 en los codones correspondientes para Gly5 y Gly13. La incorporación de estas mutaciones de ácido nucleico silenciosa aumentó en forma

significativa la expresión de las variantes A22 y B22 con la Cys N-terminal suprimida a niveles similares a la variante B09 con la Cys N-terminal suprimida. *Véase por ej.*, la Figura 7. Por consiguiente, la optimización de codones para igualar la variante B09 puede aumentar la expresión de variantes P2086 no lipidadas con la Cys N-terminal suprimida.

Un análisis adicional de las secuencias de variantes no lipidadas sugirieron optimizaciones por codones adicionales en el tallo de Gly/Ser para mejorar la expresión. Por consiguiente, se construyeron variantes no lipidadas adicionales por medio del método del Ejemplo 2 por el uso de cebadores directos que comprenden tales secuencias optimizadas por codones. Los cebadores directos que se utilizaron para generar tallos de Gly/Ser optimizados incluyen cualquiera de las siguientes secuencias:

ATGAGCTCTGGAGGTGGAGGAAGCGGGGGCGGTGGA (SEQ ID NO: 28)
M S S G G G G S G G G G (SEQ ID NO: 29)

ATGAGCTCTGGAAGCGGAAGCGGGGGCGGTGGA (SEQ ID NO: 30)
M S S G S G S G G G G (SEQ ID NO: 31)

ATGAGCTCTGGAGGTGGAGGA (SEQ ID NO: 32)
M S S G G G G (SEQ ID NO: 33)

ATGAGCAGCGGGGGCGGTGGA (SEQ ID NO: 34)
M S S G G G G (SEQ ID NO: 33)

Ejemplo 5: Optimización de la Formulación de Composición inmunogénica

Las vacunas formuladas con ISCOMATRIX generan una respuesta inmune rápida que da lugar a una reducción en el número de dosificaciones requeridas para alcanzar una tasa de respuesta mayor que 4 veces de acuerdo con lo medido en un ensayo bactericida en suero. Se inmunizaron grupos de cinco macacos rhesus con diferentes formulaciones de una vacuna rP2086 no lipidada bivalente. La vacuna incluyó una variante A05 no piruvilada y no lipidada (SEQ ID NO: 13 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida o la SEQ ID NO: 55 codificada por la SEQ ID NO: 54) y una variante B44 no piruvilada y no lipidada (SEQ ID NO: 21 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida o la SEQ ID NO: 44 codificada por la SEQ

ID NO: 51). Las unidades de adyuvante están de acuerdo con lo presentado a continuación: $AlPO_4$ es 250 mcg, ISCOMATRIX está entre 10 y 100 mcg. Las unidades de adyuvante para $AlPO_4$ mostrada en las Tablas 2 a 5 se muestran como unidades de miligramos, y por lo tanto se muestran como 0,25 (miligramos) en oposición a 250 mcg.

El cronograma de inmunización fue en las semanas 0, 4 y 24 con extracciones de sangre en las semanas 0, 4, 6 y 26. No hubo aumentos en las titulaciones de SBA luego de las dosis una para cualquiera de los grupos. Después de la dosis dos, se observó un aumento en las titulaciones de SBA y el número de respondedores de acuerdo con lo definido por un aumento de 4 veces en la titulación de SBA por encima del valor de referencia para las formulaciones que contenían el adyuvante ISCOMATRIX. Las Tablas 2 y 3 proporcionan los GMT SBA observados para una cepa de la Subfamilia A y B de fHBP respectivamente. Los GMT SBA para las formulaciones de ISCOMATRIX fueron de 3 a 19 y de 4 a 24 veces mayores que las observadas para la formulación AIPO4 para las cepas de la subfamilia A y B respectivamente. También se observaron titulaciones potenciadas después de la dosis tres para las formulaciones de ISCOMATRIX de 13 a 95 y de 2 a 10 para una cepa de la Subfamilia A y B de fHBP respectivamente en comparación con la formulación de AIPO4. El análisis de estas tasas de respuesta, de acuerdo con lo definido por un aumento de cuatro veces o mayor en la titulación de SBA sobre el valor de referencia reveló una tendencia similar (Tablas 4 y 5).

Tabla 2: Titulaciones de SBA (GMT) obtenidas contra una cepa de la Subfamilia A de MnB LP2086
Suero inmune de macacos rhesus inmunizados con diferentes formulaciones de una vacuna rP2086 bivalente

		Adyuvante		Titulación Geométrica Media (GMT)			
Vacuna	lipidación	AIPO4	ISCOMATRIX®	sem. 0	sem. 4	sem. 6	sem. 26
A05/B44	-	0,25	-	-	-	-	+
		-	10	-	-	+	+++
		0,25	10	-	-	+	++
		-	100	-	-	++	++++
		0,25	100	-	-	+	+++

Cinco monos por grupo; Cronograma de inmunización: 0, 4, 24 semanas; cronograma de extracciones de sangre 0, 4, 6 y 26 semanas. Cepa de prueba de SBA MnB M98 250771.
"-" < 8; "+" 8 a 32; "++" 33 a 128; "+++" 129 a 512; "++++" >512

Tabla 3: Titulaciones de SBA (GMT) obtenidas contra una cepa MnB LP2086 de la Subfamilia B
Suero inmune de macacos rhesus inmunizados con diferentes formulaciones de una vacuna rP2086 bivalente

		Adyuvante		Titulación Geométrica Media (GMT)			
Vacuna	lipidación	AIPO4	ISCOMATRIX®	sem. 0	sem. 4	sem. 6	sem. 26
A05/B44	-	0,25	-	-	-	+	+++
		-	10	-	-	+++	++++
		0,25	10	-	-	+++	++++
		-	100	-	-	+++	++++
		0,25	100	-	-	++	++++

Cinco monos por grupo; Cronograma de inmunización: 0, 4, 24 semanas; cronograma de extracciones de sangre 0, 4, 6 y 26 semanas. Cepa de prueba de SBA MnB CDC1127.
"-" < 8; "+" 8 a 32; "++" 33 a 128; "+++" 129 a 512; "++++" >512

Tabla 4: Número de macacos rhesus con un aumento ≥4 veces en la Titulación de SBA por el uso de una cepa MnB LP2086 de la Subfamilia A

		Adyuvante		N.° de respondedores[b]			
Vacuna	lipidación	AIPO4	ISCOMATRIX®	sem. 0	sem. 4	sem. 6	sem. 26
A05/B44	-	0,25	-	0	0	0	2
		-	10	0	0	3	5
		0,25	10	0	0	2	5
		-	100	0	0	4	5
		0,25	100	0	0	2	5

Tabla 5: Número de macacos rhesus con un aumento ≥4 veces en la Titulación de SBA por el uso de una cepa MnB LP2086 de la Subfamilia B

		Adyuvante		N.° de respondedores[b]			
Vacuna	lipidación	AIPO4	ISCOMATRIX®	sem. 0	sem. 4	sem. 6	sem. 26
A05/B44	-	0,25	-	0	0	3	5
		-	10	0	0	5	5
		0,25	10	0	0	5	5
		-	100	0	0	4	4
		0,25	100	0	0	3	5

Ejemplo 6: Inmunoprotección conferida por Variantes Lipidadas y no Lipidadas

Una variante P2086 no lipidada expresada en forma recombinante (B44) induce una amplia protección de acuerdo con lo medido por medio de SBA contra cepas que representan diversas variantes fHBP (de aproximadamente 85% a aproximadamente <92% ID) secuencias LP2086. Estas tasas de respuesta se obtuvieron para una vacuna no lipidada formulada con $AlPO_4$. Véase la Tabla 6, que muestra tasas de respuesta SBA a una cepa fHBP MnB de la subfamilia B generada por medio de una vacuna bivalente fHBP. La vacuna no lipidada (representada por un

“-“ debajo de la columna “lipidación”) incluyó 1mcg por proteína de una variante A05 no piruvilada y no lipidada (SEQ ID NO: 13 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida) y una variante B44 no piruvilada y no lipidada (SEQ ID NO: 21 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida) .

En forma alternativa, una variante P2086 no lipidada expresada en forma recombinante (B44) induce mayores respuestas inmunes de acuerdo con lo medido por medio de la titulación de SBA que una variante lipidada (B01) contra cepas que portan secuencias LP2086 similares (>92% ID) y diversas (<92% ID). Se observaron mayores tasas de respuesta (de acuerdo con lo definido por un aumento de cuatro veces o mayor en las titulaciones de SBA sobre el valor de referencia) para la vacuna que contenía el B44 rP2086 no lipidado en comparación con la vacuna lipidada rLP2086 B01 (Tabla 6).

De acuerdo con la Tabla 6, el B44 no lipidado es un componente preferido de la subfamilia B de fHBP en una composición para proporcionar una amplia cobertura contra (por ej., obtener anticuerpos bactericidas contra) cepas de variante LP2086 múltiples.

En forma sorprendente, los inventores notaron que las cepas de la variante B09 LP2086 es improbable en particular que tengan tasas de respuesta de SBA positivas con respecto a polipéptidos ORF2086 (no B09) heterológos. En particular, los inventores hallaron que B09 LP2086 es una excepción en términos de una cepa de ensayo contra la que la composición inmunogénica A05/B44 que se describe en la Tabla 6 obtuvo anticuerpos bactericidas. Por lo tanto, en una realización preferida una composición inmunogénica de la invención incluye un polipéptido B09, en particular en el contexto de una composición que incluye más de un polipéptido ORF2086 de la subfamilia B. En una realización preferida una composición inmunogénica que incluye un B44 no lipidado también puede incluir un polipéptido B09 no lipidado.

Tabla 6: Tasas de respuesta de SBA a una cepa fHBP MnB de la subfamilia B generada por vacunas fHBP bivalentes Suero inmune de macacos rhesus.

Adyuvante	Variante LP2086 de Cepa de ensayo	Vacuna	lipidación	% ID a Subfamilia Igualada para Componente de Vacuna no lipidada	% de respondedores PD3 Sem. 26
	B02	A05/B01	**+**	**99,6**	80
		A05/B44	**-**		**100**
AIPO4 0,25mg	B03	A05/B01	**+**	**86,7**	50
		A05/B44	**-**		**80**
	B09	A05/B01	**+**	**86,3**	0
		A05/B44	**-**		**0**
	B15	A05/B01	**+**	**86,7**	25
		A05/B44	**-**		**80**
	B16	A05/B01	**+**	**87,1**	0
		A05/B44	**-**		**50**
	B16	A05/B01	**+**	**87,1**	0
		A05/B44	**-**		**60**
	B24	A05/B01	**+**	**85,9**	0
		A05/B44	**-**		**60**
	B44	A05/B01	**+**	**100**	100
		A05/B44	**-**		**100**
ISCOMATRIX® (10 mcg)	A05	**A05/B44**	**-**	**100**	**100**
ISCOMATRIX® (100 mcg)	A05	**A05/B44**	**-**	**100**	**100**
ISCOMATRIX® (10 mcg)	A22	**A05/B44**	**-**	**88,9**	**80**
ISCOMATRIX® (100 mcg)	A22	**A05/B44**	**-**	**88,9**	**100**

Cinco monos por grupo; Cronograma de inmunización: 0, 4, 24 semanas; cronograma de extracciones de sangre 0, 4, 6, y 26 semanas.

Ejemplo 7: Optimización de codones de las Variantes B44 y B09

Si bien los niveles de expresión alcanzados en los ejemplos anteriores fueron adecuados para muchas aplicaciones, se deseaba una optimización adicional, y se prepararon y probaron constructos de expresión de *E. coli* que contenían optimización de codones adicionales sobre la longitud completa de la proteína. Se halló que una secuencia tal mejorada para la expresión de una proteína no Cys B44 era la secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 43. De acuerdo con lo mostrado en el Ejemplo 9, el constructo de expresión que contenía la SEQ ID NO: 43 mostró una expresión potenciada en comparación con la de la secuencia de tipo salvaje no optimizada.

La expresión de la proteína B09 suprimida de la Cys N-terminal se mejoró por medio de la aplicación de cambios de codones del constructo B44 (SEQ ID NO: 43) a B09 (SEQ ID NO: 48) optimizado con anterioridad. Para generar secuencias B09 optimizadas, la secuencia de ADN optimizada B44 (SEQ ID NO: 43) primero se alineó con la secuencia de ADN del alelo B09 (SEQ ID NO: 48). La secuencia de codificación no lipidado del alelo B09 (SEQ ID NO: 48) se optimizó para reflejar los cambios de codón observados en el alelo B44 optimizado (SEQ ID NO: 43) donde los aminoácidos entre B44 (SEQ ID NO: 44) y B09 (SEQ ID NO: 49) eran idénticos. Las secuencias de codones en el alelo B09 correspondiente a los aminoácidos idénticos entre el alelo B09 y el alelo B44 se cambiaron para reflejar el codón utilizado en la secuencia B44 optimizada (SEQ ID NO: 43). Las secuencias de codones para los aminoácidos que difieren entre B09 (SEQ ID NO: 49) y B44 (SEQ ID NO: 44) no se cambiaron en la secuencia de ADN B09.

En forma adicional, la secuencia de aminoácido B44 no lipidada (SEQ ID NO: 44) contiene dos secuencias repetidas de serina-glicina secuenciales (S-G-G-G-G)(SEQ ID NO: 56)(véanse también los aminoácidos 2 a 6 de la SEQ ID NO: 44) en su N-terminal, mientras que el alelo B09 contiene únicamente una repetición de serina-glicina en la N-terminal (véanse los aminoácidos 2 a 6 y los aminoácidos 7 a 11 de la SEQ ID NO: 49). Las dos repeticiones de serina-glicina en la N-terminal de B44 (los aminoácidos 2 a 6 y los aminoácidos 7 a 11 de la SEQ ID NO: 44) también tienen usos de codones diferentes (véanse los nucleótidos 4 a 18 y los nucleótidos 19 a 33 de la SEQ ID NO: 43), y diferentes combinaciones de la repetición B44 de serina-glicina optimizada (por ej., ya sea los nucleótidos 4 a 18 de la SEQ ID NO: 43, o los nucleótidos 19 a 33 de la SEQ ID NO: 43, o una combinación de los mismos) se aplicaron a la secuencia de ADN B09 (SEQ ID NO: 48, por ej., aplicados a los nucleótidos 4 a 18 de la SEQ ID NO: 48) con el fin de examinar el efecto de la expresión de proteínas recombinantes.

Se construyeron tres versiones diferentes de B09 optimizadas: la SEQ ID NO: 45 contiene tanto repeticiones de serina-glicina (GS1 y GS2) (los ácidos nucleicos 4 a 33 de la SEQ ID NO: 43) del B44 optimizado, la SEQ ID NO: 46 contiene GS1 (los ácidos nucleicos 4 a 18 de la SEQ ID NO: 43), y la SEQ ID NO: 47 contiene GS2 (los ácidos nucleicos 19 a 33 de la SEQ ID NO: 43). El ADN para todas las secuencias optimizadas por codones anteriores se sintetizaron químicamente por el uso de química estándar en la técnica. El ADN resultante se clonó en vectores de expresión de plásmidos apropiados y se probaron por la expresión en células huéspedes de *E.*

coli de acuerdo con lo descripto en los Ejemplos 8 y 9.

Ejemplo 8: Método para Expresar ORF2086, variante B09

Se transformaron células de la cepa K-12 de *E. coli* (derivados de W3110 (CGSC4474) de tipo salvaje que tiene supresiones en *recA*, *fhuA* y *araA*) con el plásmido pEB063, que incluye la SEQ ID NO: 45, pEB064, que incluye la SEQ ID NO: 46, plásmido pEB065, que incluye la SEQ ID NO: 47, o plásmido pLA134, que incluye la SEQ ID NO: 48. Las modificaciones preferidas para la cepa K-12 son útiles para los propósitos de fermentación pero no se requieren para la expresión de las proteínas.

Las células se inocularon en un medio definido con sales de glucosa. Después de 8 horas de incubación a 37ºC se aplicó una alimentación de glucosa lineal y la incubación prosiguió durante 3 horas adicionales. Se agregó Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) al cultivo hasta una concentración final de 0,1 mM seguido por 12 horas de incubación a 37°C. Las células se recolectaron por medio de centrifugación a 16.000xg durante 10 minutos y se lisaron por medio de la adición de Easy-Lyse™ Cell Lysing Kit" de Lienco Technologies (St. Louis, MO) y de un tampón de carga. Los lisatos depurados se analizaron por la expresión de B09 por medio de tinción de Coomassie de geles SDS-PAGE y/o análisis de Western blot con cuantificación por medio de un densitómetro de barrido. Los resultados de la densitometría de barrido se encuentran a continuación en la Tabla 7:

Tabla 7: Datos de expresión en *E. coli*

Proteína	Célula huésped	Plásmido	Porcentaje de proteína celular total a las 12 horas después de la inducción por IPTG, de acuerdo con lo medido por SDS-PAGE, densitometría de barrido
B09	K-12 de *E. coli*	pEB063 SEQ ID NO: 45	24%
B09	K-12 de *E. coli*	pEB065 SEQ ID NO: 47	12%
B09	K-12 de *E. coli*	pEB064 SEQ ID NO: 46	38%
B09	K-12 de *E. coli*	pLA134 SEQ ID NO: 48	13%

Ejemplo 9: Método para Expresar ORF2086, variante B44

Se transformaron células de la cepa B de *E. coli* (BLR(DE3), Novagen) con el plásmido pLN056, que incluye la SEQ ID NO: 51. Las células de la cepa K-12 de *E. coli* (derivado de W3110 de tipo salvaje) se transformaron con el plásmido pDK087,

que incluye la SEQ ID NO: 43. Las células se inocularon en un medio definido con sales de glucosa. Después de 8 horas de incubación a 37ºC se aplicó una alimentación de glucosa lineal y prosiguió la incubación durante 3 horas adicionales. Se agregó Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) al cultivo hasta una concentración final de 0,1 mM seguido por 12 horas de incubación a 37°C. Las células se recolectaron por medio de centrifugación a 16.000xg durante 10 minutos y se lisaron por medio de la adición de Easy-Lyse™ Cell Lysing Kit" de Lienco Technologies (St. Louis, MO) y de un tampón de carga. Los sobrenadantes se analizaron por la expresión de B09 por medio de tinción de COOMASSIE de geles SDS-PAGE y/o análisis de Western blot, con cuantificación por medio de un densitómetro de barrido. Los resultados de la densitometría de barrido se encuentran a continuación en la Tabla 8:

Tabla 8: Datos de expresión en *E. coli*

Proteína	Célula huésped	Plásmido	Porcentaje de proteína celular total a las 12 horas después de la inducción por IPTG, de acuerdo con lo medido por SDS-PAGE, densitometría de barrido.
B44	B de *E. coli*	pLN056 SEQ ID NO: 51	1%
B44	K-12 de *E. coli*	pDK087 SEQ ID NO: 43	17%

Ejemplo 10: Piruvilación

El presente ejemplo demuestra que el residuo de la Cys N-terminal de proteínas ORF2086 no lipidadas se puede volver piruvilado cuando se expresa en, por ejemplo, *E. coli*.

Se monitoreó la acumulación de proteínas heterólogas durante la producción de las variantes A05 (SEQ ID NO: 13) y B44 (SEQ ID NO: 21) por el uso de cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC). Esta separación se interconectó con un espectrómetro de masas con detector de tiempo de vuelo cuadrupolo (QTOF-MS) para proporcionar un medio para monitorear la formación de variantes relacionadas con el producto.

Después de expresarse en las células huéspedes B y/o K-12 de *E. coli*, los productos derivados de estas fermentaciones se sometieron a un procedimiento de purificación durante el cual se observó una modificación del producto. La

deconvolución de los espectros de masa caracterizaron las variantes como que exhibían cambios de masa de +70 Da, en comparación con los productos nativos de 27640 y 27572 Da para A05 y B44, respectivamente.

La literatura publicada indicó que un cambio de masa de +70 Da se había observado previamente en las proteínas y se ha atribuido a la piruvilación del residuo amino-terminal.

La presencia y ubicación del grupo piruvato se confirmó por el uso de los datos de fragmentación de espectros de masas (MS/MS). Los datos indicaron que la modificación fue en un residuo de cisteína amino-terminal, es decir, un aminoácido en la posición 1, de acuerdo con A05 y B44. Para A05, el porcentaje de polipéptidos piruvilados fue de aproximadamente 30%, en comparación con el número total de polipéptidos A05 (SEQ ID NO: 13). Para B44 el porcentaje de polipéptidos piruvilados fue de aproximadamente 25%, en comparación con el número total de polipéptidos B44 (SEQ ID NO: 21).

Cuando se purificaron las variantes A05 (SEQ ID NO: 13 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida o la SEQ ID NO: 55) y B44 (SEQ ID NO: 21 donde la Cys N-terminal en la posición 1 está suprimida o la SEQ ID NO: 44), que no contienen una cisteína amino-terminal, no hubo una piruvilación detectable (+70 Da).

Ejemplo 11: Inmunogenicidad de B09 y B44, en forma individual y en combinación

Se inmunizaron 5 a 10 grupos de monos macacos rhesus con la variante B09 (SEQ ID NO: 49 codificada por la SEQ ID NO: 48) o la variante B44 (SEQ ID NO: 44 codificada por la SEQ ID NO: 43), o la A05, B09 y B44 (SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 49 codificada por la SEQ ID NO: 48, y SEQ ID NO: 44 codificada por la SEQ ID NO: 43, respectivamente) formulada con 250 mcg de $AlPO_4$ por dosis. Los monos se vacunaron por la vía intramuscular en las semanas 0, 4 y 8 con 10 mcg cada uno de fHBP no lipidada sola o en combinación de acuerdo con lo enumerado en las Tablas 9 y 10. Ambas semanas 0 y 12 se analizaron las muestras de suero en SBA contra cepas MnB con ya sea las variantes fHBP de la subfamilia A o la subfamilia B. Los respondedores se registraron como los animales con un aumento x 4 en la titulación. La variante B44 probada fue el constructo optimizado (SEQ ID NO: 43) y las amplias tasas de respuesta que se observaron en estudios previos (tabla anterior) se mantuvieron para el constructo optimizado (Tabla 9) la vacuna B44 sola o en combinación con B09. La vacuna B09 sola (Tabla 10) también podría generar

respuestas inmunes con reacción ampliamente cruzada (Tabla 10).

Tabla 9: Tasas de respuesta obtenidas para vacunas fHBP no lipidadas en macacos rhesus

Vacuna (10 mcg por proteína;	% ≥ Aumento X 4 Contra Variante de Prueba (PD3; 10 macacos rhesus por grupo)				
	A05 (SEQ ID NO: 13)	B44 (SEQ ID NO: 21)	B16 (SEQ ID NO: 60)	B24 (SEQ ID NO: 20)	B09 (SEQ ID NO: 18)
B44	0	80	30	40	30
B44 + B09 +A05	60	80	40	50	30

Se inmunizaron macacos rhesus (n= 10) por vía i.m. en las semanas 0, 4 y 8 con 10 mcg cada uno de fHBP no lipidada sola o en combinación de acuerdo con lo enumerado en la columna de Vacuna en la formulación con 250 mcg de $AlPO_4$. Ambas semanas 0 y 10 se analizaron las muestras de suero en SBA contra las cepas MnB de acuerdo con lo enumerado en la tabla. Los respondedores se registraron como los animales con un aumento x 4 en la titulación.

La Tabla 9 indica, por ejemplo, que una composición que incluye una combinación de B44, B09, y A05 no piruvilados y no lipidados mostró una mayor cobertura cruzada contra las variantes de prueba en comparación con la cobertura cruzada de una composición que incluye B44 solo. En vista de los resultados mostrados en la presente solicitud, que incluye en particular la Tabla 6 y la Tabla 9 juntas, las composiciones que incluyen B44, B09 y A05 solos o en combinación son realizaciones preferidas de la presente invención. En particular, se revelan las composiciones que incluyen tanto B44 como B09. Tal composición con preferencia además incluye una polipéptido de subfamilia A, tal como en particular A05.

Tabla 10: Tasas de respuesta obtenidas para vacuna fHBP B09 no lipidada en macacos rhesus

Vacuna (10 mcg por proteína)	% ≥ Aumento X 4 Contra Variante de Prueba (PD3; 5 macacos rhesus por grupo)				
	A05	B44	B16	B24	B09
B09	40	60	40	60	60

Se inmunizaron macacos rhesus (n= 5) por vía i.m. en las semanas 0, 4 y 8 con 10 mcg cada uno de fHBP no lipidada sola o en combinación de acuerdo con lo enumerado en la columna de Vacuna en la formulación con 250 mcg de $AlPO_4$. Ambas semanas 0 y 10 se analizaron las muestras de suero en SBA contra las cepas MnB de acuerdo con lo enumerado en la tabla. Los respondedores se registraron como los animales con un aumento x 4 en la titulación.

Ejemplo 12: Inmunoprotección conferida por constructo de Variante Lipidada y no Lipidada

Veinte conejos blancos hembra de Nueva Zelanda, 2,5 a 3,5 kg, obtenidos de Charles River Canada, se pre-visualizaron por medio de ELISA celular completo y se seleccionaron 10 animales para este estudio con base en sus bajas titulaciones anteriores contra las cepas de prueba que representan variantes B02 (SEQ ID NO: 16) y B44 (SEQ ID NO: 21) de fHBP (Tabla 11). Se inmunizó un grupo de tres animales con 100 µg de cada proteína formulada con 50 µg de ISCOMATRIX por 0,5 ml de dosis en las semanas 0, 4 y 9 (Tabla 12). El Grupo 1 se vacunó con B44 no lipidado (SEQ ID NO: 44). Se incluyó un grupo de control que se vacunó con B01 lipidado formulado con AlP04 (250 mcg). Se les extrajo sangre a los conejos en las semanas 0, 4, 9 y 10. Se prepararon sueros individuales de la semana 10 y se analizaron por medio de un ensayo bactericida en suero contra múltiples cepas meningocócicas del serogrupo B de fHBP de la subfamilia B.

Tabla 11: Conejos Utilizados en el Estudio

Especie:	Conejo
Cepa:	Blanco de Nueva Zelanda
Fuente:[a]	Charles River Laboratory
N.° de Animales Por Grupo:	3
N.° Total de Animales:	9
Edad y Sexo:	Hembra
Peso:	2,5 a 3,5 kg

Tabla 12

Grupo	# de Animales	Variante	lipidada	rfHBP (dosis de µg/0,5 ml)	ISCOMATRIX (dosis de µg/0,5 ml)	Fosfato de Aluminio (dosis de µg/0,5 ml)
1	3	B44	-	100	50	
2	3	B01	-	100	50	
3	3	B01	+	100	-	100

Cronograma de inmunización en las Semanas 0, 4, 9; Cronograma de Extracciones en

las Semanas 0, 4, 9,10

Ensayo bactericida en suero (SBA): Se llevó a cabo un ensayo bactericida en suero (SBA) basado en microcolonias contra múltiples cepas meningocócicas del serogrupo B (Tabla 13) en muestras de suero individuales. Los sueros humanos de donantes se calificaron como la fuente de complemento para la cepa probada en el ensayo. Se interpolaron las titulaciones bactericidas dependientes de anticuerpos mediadas por complementos y se expresaron como la recíproca de la dilución del suero de prueba que eliminó el 50% de las células meningocócicas en el ensayo. El límite de detección del ensayo fue una titulación de SBA de 4. A una titulación de SBA de <4 se le asignó número de 2. Se calculó un aumento ≥ 4 veces de las titulaciones de SBA en los sueros de la semana 10 en comparación con las titulaciones antes de la extracción y se comparó.

La actividad de anticuerpos bactericidas en suero de acuerdo con lo medido en el SBA es el sustituto inmunológico de protección contra la enfermedad meningocócica. Se determinó la capacidad de inmunización con rfHBP no lipidado para obtener anticuerpos bactericidas en conejos por medio de SBA. El SBA mide el nivel de anticuerpos en una muestra de suero por medio de la imitación de la lisis bacteriana mediada por complementos que sucede en forma natural. Se analizaron las muestras de suero de conejo recolectada de la semana 10 por medio de SBA contra cepas con un fHBP B44 o un fHBP B02. De acuerdo con lo mostrado en la Tabla 13, una semana después de la tercera inmunización (semana 10), todas las muestras de suero exhibieron una actividad bactericida contra ambas cepas de prueba (Tabla 13). El B44 no lipidado (SEQ ID NO: 44) fuer más inmunogénico que el B01 no lipidado en Conejos de Nueva Zelanda contra estas cepas. El B44 no lipidado (SEQ ID NO: 44) formulado con el adyuvante iscomatrix dio titulaciones comparables con el B01 lipidado formulado con fosfato de aluminio contra estas cepas. Los sueros de conejo antes de la extracción por lo general no mostraron actividad bactericida preexistente contra las cepas probadas.

Tabla 13: Actividad bactericida en suero contra Cepas de fHBP de la Subfamilia B en Conejos Blancos de Nueva Zelanda Vacunados con fHBP No lipidado Recombinante

	Titulación SBA GMT contra variante de prueba	
Variante de la Subfamilia B (formulación)	B44 (SEQ ID NO: 21)	B02 (SEQ ID NO: 16)
B44 no lipidada (SEQ ID NO: 44)(ISCOMATRIX)	6675	7140
B01 no lipidada (ISCOMATRIX)	625	1052
B01 lipidada ($AlPO_4$)	10099	10558

Ejemplo 13: Inmunogenicidad de seis proteínas de unión al factor H no lipidadas en conejos blancos de Nueva Zelanda.

Se inmunizaron grupos de 5 conejos con variantes fHBP no lipidadas de acuerdo con lo descripto en la Tabla 14. Las vacunas se administraron en las semanas 0, 4 y 9. Las muestras de suero de conejo recolectadas de las semanas 0 y 10 se analizaron por medio de SBA contra las cepas con secuencias homólogas y heterólogas de fHBP. La Tabla 14 muestra los porcentajes de respondedores luego de la tercera inmunización. Una semana después de la tercera inmunización (semana 10), todas las muestras de suero exhibieron una actividad bactericida contra las cepas homólogas así como también otras cepas de prueba de la misma subfamilia fHBP. Los sueros de conejos antes de la extracción por lo general no mostraron actividad bactericida preexistente contra las cepas probadas.

Tabla 14: Tres Por ciento posterior a la Dosis de Respondedores en Conejos Blancos de Nueva Zelanda Vacunados con fHBP Recombinantes No lipidados

MnB fHBP	Dosis/0,5 ml	$AlPO_4$/0,5 ml	n	B09	B16	B24	B44	A05	A12	A22
A05	100 mcg	0,25 mg	5					100	80	100
A12	100 mcg	0,25 mg	5					100	100	100
A22	100 mcg	0,25 mg	5					80	80	80
B09	100 mcg	0,25 mg	5	100	80	60	80			
B22	100 mcg	0,25 mg	5	40	100	60	100			
B44	100 mcg	0,25 mg	5	0	60	40	100			
A05, A12, B22, B44	100 mcg cada uno/400 mcg en total	0,25 mg	5	100	100	60	100	100	100	100

Proteínas MnB fHBP Utilizadas

A05	SEQ ID NO: 13, donde la Cys en la posición 1 está suprimida, o la SEQ ID NO: 55 codificada por la SEQ ID NO: 54
A12	SEQ ID NO: 14, donde la Cys en la posición 1 está suprimida
A22	SEQ ID NO: 15, donde la Cys en la posición 1 está suprimida
B09	SEQ ID NO: 18, donde la Cys en la posición 1 está suprimida, o la SEQ ID NO: 49 codificada por la SEQ ID NO: 48.
B22	SEQ ID NO: 19, donde la Cys en la posición 1 está suprimida
B44	SEQ ID NO: 21, donde la Cys en la posición 1 está suprimida, o la SEQ ID NO: 44 codificada por la SEQ ID NO: 51

Variantes de prueba en la Tabla 14:

B09 (SEQ ID NO: 18)	B16 (SEQ ID NO: 60)	B24 (SEQ ID NO: 20)	B44 (SEQ ID NO: 21)	A05 (SEQ ID NO: 13)	A12 (SEQ ID NO: 14)	A22 (SEQ ID NO: 15)

Ejemplo 14:

> A05 no lipidado (SEQ ID NO: 55)

SSGSGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAEK
TFKVGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSAVVALQI
EKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTID
FAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGD
RAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

>pEB042 (SEQ ID NO: 65)

ATGAGCTCTGGAAGCGGAAGCGGGGGCGGTGGAGTTGCAGCAGACATTGGAACA
GGATTAGCAGATGCACTGACGGCACCGTTGGATCATAAAGACAAAGGCTTGAAAT
CGCTTACCTTAGAAGATTCTATTTCACAAAATGGCACCCTTACCTTGTCCGCGCAA
GGCGCTGAAAAAACTTTTAAAGTCGGTGACAAAGATAATAGCTTAAATACAGGTAA
ACTCAAAAATGATAAAATCTCGCGTTTTGATTTCGTGCAAAAAATCGAAGTAGATG
GCCAAACCATTACATTAGCAAGCGGTGAATTCCAAATATATAAACAAGACCATTCA
GCAGTCGTTGCATTGCAAATTGAAAAAATCAACAACCCCGACAAAATCGACAGCCT
GATAAACCAACGTTCCTTCCTTGTCAGCGGTTTGGGCGGTGAACATACAGCCTTC
AACCAATTACCAAGCGGCAAAGCGGAGTATCACGGTAAAGCATTTAGCTCAGATG
ATGCAGGCGGTAAATTAACTTATACAATTGACTTTGCAGCAAAACAAGGACATGGC
AAAATTGAACATTTAAAAACACCCGAACAGAACGTAGAGCTCGCATCCGCAGAACT
CAAAGCAGATGAAAAATCACACGCAGTCATTTTGGGTGACACGCGCTACGGCAGC
GAAGAAAAAGGTACTTACCACTTAGCTCTTTTTGGCGACCGAGCTCAAGAAATCG
CAGGTAGCGCAACCGTAAAGATAAGGGAAAAGGTTCACGAAATTGGGATCGCGG
GCAAACAATAA

> A12 no lipidado (SEQ ID NO: 66)

SSGGGGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGA
EKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIE
KINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSID

FTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGD
RAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

>pEB043(SEQ ID NO: 67)

ATGAGCTCTGGAGGTGGAGGAAGCGGGGGCGGTGGAGTTGCAGCAGACATTGG
AGCAGGATTAGCAGATGCACTGACGGCACCGTTGGATCATAAAGACAAAAGTTTG
CAGTCGCTTACCTTAGATCAGTCTGTCAGGAAAAATGAGAAACTTAAGTTGGCGG
CGCAAGGCGCTGAAAAAACTTATGGAAACGGTGACAGCTTAAATACAGGTAAACT
CAAAAATGATAAAGTCTCGCGTTTTGATTTCATTCGTCAAATCGAAGTAGATGGCC
AAACCATTACATTAGCAAGCGGTGAATTCCAAATATATAAACAAAACCATTCAGCA
GTCGTTGCATTGCAAATTGAAAAAATCAACAACCCCGACAAAATCGACAGCCTGAT
AAACCAACGTTCCTTCCTTGTCAGCGGTTTGGGCGGTGAACATACAGCCTTCAAC
CAATTACCAGACGGCAAAGCGGAGTATCACGGTAAAGCATTTAGCTCAGATGATC
CGAACGGTAGGTTACACTATTCCATTGACTTTACCAAAAAACAAGGATACGGCAGA
ATTGAACATTTAAAAACGCCCGAACAGAACGTAGAGCTCGCATCCGCAGAACTCA
AAGCAGATGAAAAATCACACGCAGTCATTTTGGGTGACACGCGCTACGGCGGCG
AAGAAAAAGGTACTTACCACTTAGCCCTTTTTGGCGACCGCGCTCAAGAAATCGC
AGGTAGCGCAACCGTAAAGATAAGGGAAAAGGTTCACGAAATTGGGATCGCGGG
CAAACAATAA

>A22 no lipidado (SEQ ID NO: 68)

SSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYG
NGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPD
KIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQG
HGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIA
GSATVKIREKVHEIGIAGKQ

>pEB058 (SEQ ID NO: 69)

ATGAGCTCTGGAGGTGGAGGAGTTGCAGCAGACATTGGAGCAGGATTAGCAGAT
GCACTGACGGCACCGTTGGATCATAAAGACAAAAGTTTGCAGTCGCTTACCTTAG
ATCAGTCTGTCAGGAAAAATGAGAAACTTAAGTTGGCGGCGCAAGGCGCTGAAAA
AACTTATGGAAACGGTGACAGCTTAAATACAGGTAAACTCAAAAATGATAAAGTCT
CGCGTTTTGATTTCATTCGTCAAATCGAAGTAGATGGCCAACTTATTACATTAGAAA
GCGGTGAATTCCAAATATATAAACAAGACCATTCAGCAGTCGTTGCATTGCAAATT
GAAAAAATCAACAACCCCGACAAAATCGACAGCCTGATAAACCAACGTTCCTTCCT

TGTCAGCGGTTTGGGCGGTGAACATACAGCCTTCAACCAATTACCAAGCGGCAAA
GCGGAGTATCACGGTAAAGCATTTAGCTCAGATGATGCAGGCGGTAAATTAACTT
ATACAATTGACTTTGCAGCAAAACAAGGACATGGCAAAATTGAACATTTAAAAACA
CCCGAACAGAACGTAGAGCTCGCATCCGCAGAACTCAAAGCAGATGAAAAATCAC
ACGCAGTCATTTTGGGTGACACGCGCTACGGCGGCGAAGAAAAAGGTACTTACCA
CTTAGCTCTTTTTGGCGACCGAGCTCAAGAAATCGCAGGTAGCGCAACCGTAAAG
ATAAGGGAAAAGGTTCACGAAATTGGGATCGCGGGCAAACAATAA

> A62 (SEQ ID NO: 70). GenBank: ACI46789,1

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTY
GNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQ
DSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDF
AAKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDR
AQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

>A62 no lipidado (SEQ ID NO: 71)

SSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYG
NGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQD
SEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAA
KQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRA
QEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

>pLA164 (SEQ ID NO: 72)

ATGAGCAGCGGAGGGGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGTGCGGGGCTTGCCGA
TGCACTAACCGCACCGCTCGACCATAAAGACAAAGGTTTGCAGTCTTTAACGCTG
GATCAGTCCGTCAGGAAAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAA
AAAACTTATGGAAACGGCGACAGCCTTAATACGGGCAAATTGAAGAACGACAAGG
TCAGCCGCTTCGACTTTATCCGTCAAATCGAAGTGGACGGGAAGCTCATTACCTT
GGAGAGCGGAGAGTTCCAAGTGTACAAACAAAGCCATTCCGCCTTAACCGCCCTT
CAGACCGAGCAAGTACAAGACTCGGAGGATTCCGGGAAGATGGTTGCGAAACGC
CAGTTCAGAATCGGCGACATAGCGGGCGAACATACATCTTTTGACAAGCTTCCCA
AAGGCGGCAGTGCGACATATCGCGGGACGGCGTTCGGTTCAGACGATGCTGGCG
GAAAACTGACCTATACTATAGATTTCGCCGCCAAACAGGGACACGGCAAAATCGA
ACACTTGAAAACACCCGAGCAAAATGTCGAGCTTGCCTCCGCCGAACTCAAAGCA
GATGAAAAATCACACGCCGTCATTTTGGGCGACACGCGCTACGGCGGCGAAGAA

AAAGGCACTTACCACCTCGCCCTTTTCGGCGACCGCGCCCAAGAAATCGCCGGC
TCGGCAACCGTGAAGATAAGGGAAAAGGTTCACGAAATCGGCATCGCCGGCAAA
CAGTAA

> pDK086 (SEQ ID NO: 73)

ATGTCCAGCGGTTCAGGCAGCGGCGGTGGAGGCGTGGCAGCAGATATCGGAAC
AGGTTTAGCAGATGCTCTGACAGCACCCTTAGATCACAAAGACAAAGGACTTAAAT
CACTGACATTGGAAGATTCTATCTCGCAAAATGGTACTCTCACTCTTTCAGCCCAA
GGCGCAGAAAAAACATTTAAAGTAGGCGATAAAGATAACTCCTTAAATACAGGTAA
ATTAAAAAATGACAAAATCTCACGGTTTGATTTCGTTCAGAAAATTGAAGTAGATGG
ACAAACGATTACATTAGCAAGCGGCGAATTCCAAATTTATAAACAAGACCATTCAG
CAGTAGTAGCATTACAAATCGAAAAAATTAACAACCCGGACAAAATTGATTCTCTTA
TTAACCAACGCTCTTTTCTCGTATCAGGACTTGGTGGTGAACATACAGCGTTTAAT
CAACTGCCGTCAGGAAAAGCAGAATATCATGGTAAAGCATTTTCATCAGACGACG
CAGGTGGCAAACTGACCTATACTATTGACTTTGCAGCAAAACAGGGACATGGAAA
AATTGAACATTTAAAAACACCCGAACAGAACGTAGAACTGGCCTCAGCAGAATTGA
AAGCTGATGAAAAATCCCATGCAGTAATTTTAGGCGATACACGTTACGGTAGCGAA
GAAAAAGGTACATATCACTTAGCTCTTTTTGGCGATCGTGCTCAAGAAATTGCTGG
TTCCGCAACAGTTAAAATCCGTGAAAAAGTACATGAAATCGGCATTGCAGGTAAAC
AATAA

>A29 (SEQ ID NO: 74)

CSSGGGGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQG
AEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVA
LQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGDKAEYHGKAFSSDDPNGRLH
YTIDFTNKQGYGRIEHLKTPELNVDLASAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLAL
FGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>B22 no lipidado (SEQ ID NO: 75)

SSGGGGVAADIGAVLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYG
NGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQD
SEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDASGKLTYTIDFAA
KQGHGKIEHLKSPELNVDLAASDIKPDKKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQ
EVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ

> A05 no lipidado (SEQ ID NO: 76) (pPW102)

CGSSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAEKTF
KVGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKI
NNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFA
AKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRA
QEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

> A05 no lipidado (SEQ ID NO: 77)

GSSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAEKTFK
VGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKIN
NPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAA
KQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQ
EIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

>Consenso (SEQ ID NO: 78)

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTY
GNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQSHSALVALQTEQINN
SDKSGSLINQRSFRISGIAGEHTAFNQLPKGGKATYRGTAFSSDDAGGKLTYTIDFAAK
QGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQ
EIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

>Consenso (SEQ ID NO: 79)

SSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYG
NGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQSHSALVALQTEQINNS
DKSGSLINQRSFRISGIAGEHTAFNQLPKGGKATYRGTAFSSDDAGGKLTYTIDFAAK
QGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQ
EIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

Ejemplo 15: Generación de variantes no lipidadas de rP2086de la subfamilia A-Clonación de genes de fHBP no lipidados

La secuencia de codificación de la proteína no lipidada A05 fHBP (SEQ ID NO: 55) se alineó a una secuencia B44 optimizada por expresión (SEQ ID NO: 43). Cuando los aminoácidos entre las dos eran idénticos, se utilizó el codón de la B44 (SEQ ID NO: 43) para sustituirse en el gen A05. La secuencia optimizada se sintetizó de nuevo en Celtek Genes, con el agregado de sitios de restricción endonucleasa NdeI y BamHI en las N- y C-terminales, respectivamente. El gen resultante (SEQ ID NO: 65) se

subclonó en pET30a en esos sitios.

Se expresó la fHBP A12 no lipidada recombinante (SEQ ID NO: 66) a partir de pEB043 (SEQ ID NO: 67). El alelo A12 se optimizó por expresión por medio de Blue Heron Technologies. Este gen se optimizó por medio del mismo proceso que para A05 (pEB042). En adición, los codones amino-terminales B44 SGGGGSGGGG (residuos de aminoácidos 2 a 11 de la SEQ ID NO: 44) optimizados por Blue Heron reemplazaron los codones A12 SSGGGG nativos (residuos de aminoácidos 1 a 6 de la SEQ ID NO: 66). La secuencia optimizada se sintetizó de nuevo en Celtek Genes, con el agregado de sitios de restricción endonucleasa *NdeI* y *BamHI* en las N- y C-terminales, respectivamente. El gen resultante (SEQ ID NO: 67) se subclonó en pET30a en esos sitios.

Se expresó la fHBP A22 no lipidada recombinante (SEQ ID NO: 68) a partir de pEB058 (SEQ ID NO: 69). Este gen se optimizó por medio del mismo proceso que para pEB042. En adición, los codones amino-terminales B44 SGGGG (residuos de aminoácidos 2 a 6 de la SEQ ID NO: 44) optimizados por Blue Heron reemplazaron los codones A22 SSGGGG nativos (residuos de aminoácidos 1 a 6 de la SEQ ID NO: 68). La secuencia optimizada se sintetizó de nuevo en Celtek Genes, con el agregado de sitios de restricción endonucleasa NdeI y BamHI en las N- y C-terminales, respectivamente. El gen resultante (SEQ ID NO: 69) se subclonó en pET30a en esos sitios.

Se expresó la fHBP A62 recombinante (SEQ ID NO: 71) a partir de pLA164 (SEQ ID NO: 72). El alelo A62_002 de la cepa 0167/03 se amplificó por PCR con cebadores que contenían sitios de restricción endonucleasa NdeI y BamHI en las N- y C-terminales, respectivamente. El gen resultante (SEQ ID NO: 72) se subclonó en pET30a en esos sitios.

Ejemplo 16: Expresión, Fermentación, y Purificación de proteínas rP2086 de la Subfamilia A de *cepas de expresión de E. coli*

Se utilizó BLR(DE3) E. coli B recA- transformado con pLA164 (SEQ ID NO: 72) para la expresión de A62 (SEQ ID NO: 71). El plásmido pEB042 (SEQ ID NO: 65) se transformó en el huésped de *E. coli* BD643 (W3110:DE3 ΔrecA ΔfhuA ΔaraA) para dar la cepa BD660 para la expresión de A05 (SEQ ID NO: 55). La expresión de A22 (SEQ ID NO: 68) fue a partir de la cepa BD592 que consiste en el plásmido pEB058 (SEQ ID NO: 69) que reside en el huésped BD559 (que también es W3110:DE3 ΔrecA ΔfhuA ΔaraA). Por último, el plásmido pEB043 (SEQ ID NO: 67) se transformó en el huésped

BD483 (W3110:DE3 ΔrecA) para dar la cepa BD540 para la expresión de A12 (SEQ ID NO: 66).

Fermentación

Se fermentaron cepas de expresión en un medio mínimo basado en glucosa. Se inoculó un cultivo de inicio del día anterior en diez litros de fermentadores operados a 37ºC, 1vvm de aeración con control en cascada dO a 20%. Cuando se retiró la glucosa en lotes del medio (a ~OD_{600}=15), se inició una alimentación de glucosa lineal limitante a 3,8 g/L/hr. La alimentación prosiguió hasta la inducción con 0,1mM de IPTG y a través de un período de expresión de proteínas posterior. Para la expresión de A05 (SEQ ID NO: 55), la cepa BD660 se indujo a OD_{600}=25 y la fermentación prosiguió durante 7 horas después de la inducción (HPI). La expresión de A22 (SEQ ID NO: 68) y A12 (SEQ ID NO: 66) de las cepas BD592 y BD540, respectivamente, se alcanzó por medio de la inducción a OD_{600}=40 y por medio de la fermentación durante 24 HPI. Al final de la fermentación, las pastas celulares se recolectaron por medio de centrifugación.

A62 (SEQ ID NO: 71)

Las proteínas rP2086 se producen como proteínas solubles en el citoplasma de las cepas de *E. coli*. El extracto citoplásmico soluble en forma típica se obtiene por medio del descongelamiento de células congeladas que expresan una variante particular de la subfamilia A de rP2086 en un tampón hipotónico (10mM de Hepes-NaOH pH 7,4 que contiene inhibidores de proteasa) y que altera las células en un Microfluidizador bajo ~20.000 psi. Se agregan ARNse y ADNse para digerir los ácidos nucleicos y el extracto citoplásmico se recolecta como el sobrenadante luego de la centrifugación a baja velocidad cualquier célula intacta y luego alta velocidad ($\geq$100,000xg) para eliminar membranas, paredes celulares y otros componentes subcelulares más grandes. El extracto citoplásmico está clarificado además por medio de ajustes secuenciales a 25% luego 50% saturado+9 sulfato de amonio y por medio de la eliminación de material precipitado después de cada ajuste por medio de centrifugación a baja velocidad. Los componentes celulares iónicos de bajo peso molecular luego se eliminan por medio de la adsorción de la rP2086 en 50% de sulfato de amonio saturado en un tampón de 10mM de Hepes-NaOH pH 7,4, 1mM de Na_2EDTA en una columna de interacción hidrofóbica (fenil sefarosa adquirida de GE Healthcare), luego por medio de la elución de la rP2086 por medio de la disminución

lineal de la concentración de sulfato de amonio hasta 0% con un tampón de 10mM de Hepes-NaOH pH 7,4, 1mM de Na_2EDTA. La mayor parte de las proteínas cargadas en forma negativa luego se eliminan por medio del ajuste del rP2086 que contiene fracciones hasta un tampón de 10mM de Tris-HCl, pH 8,6, 1mM de Na2EDTA, por medio del paso de las fracciones reunidas sobre una columna de intercambio de aniones (TMAE adquirido de EMD) equilibrada con el mismo tampón. La rP2086 luego se purifica en forma adicional por medio de cromatografía en hidroxiapatita cerámica (obtenida de BioRad) por medio del intercambio del tampón que contiene la rP2086 para 10mM de Hepes-NaOH, pH 7,4 que contiene 1mM de fosfato de sodio que adsorbe la proteína en la hidroxiapatita cerámica luego por medio de la elución con un gradiente lineal de fosfato de sodio hasta 250mM a un pH de 7,4. Las operaciones de unidad enumeradas con anterioridad a menudo son suficientes para dar los miembros rP2086 de la subfamilia A purificados. Sin embargo, dado que el nivel de expresión puede variar de a 10 veces, cuando la rP2086 está expresada en el extremo inferior del intervalo o cuando se requiere rP2086 ultra puro (en concentraciones altas para determinaciones estructurales de NMR), se agregan las siguientes operaciones de unidad adicionales: cromatoenfoque seguido por cromatografía de hidroxiapatita cerámica. El tampón que contiene proteína rP2086 del paso de hidroxiapatita anterior se intercambia con 25mM de Tris-acetato, pH 8,3 y la proteína se adsorbe en una columna PBE94 de cromatoenfoque (obtenida de GE Healthcare) equilibrada con el mismo tampón y luego se eluye con un tampón de politampón 94-acetato, pH 6. Las proteínas rP2086 se eluirán en sus ~pI y se reúnen las fracciones que contienen la proteína. El tampón dela rP2086 que contiene fracciones luego se intercambia con 10mM de Hepes-NaOH pH 7,4 que contiene 1mM de fosfato de sodio y se adsorbe y se eluyeron al igual que con anterioridad. Los miembros rP2086 de la subfamilia A preparados por medio de este proceso en forma típica son >95% homogéneos por medio de análisis SDS-PAGE y más a menudo >99% homogéneos.

A05, A12 y A22 (SEQ ID NOs: 55, 66, y 68, respectivamente)

Al final de la fermentación, la suspensión celular se recubre por medio de centrifugación continua y se resuspende hasta ~1/4 del volumen de la fermentación original en 20 mM de Tris, 5 mM de EDTA, pH 6,0. La lisis de la suspensión celular se alcanza por medio de homogenización a alta presión (2 pasadas, 4000 a 9000 psi). Se agrega DADMAC al homogenado hasta una concentración final de 0,5%. La solución se agita a 15 a 25 ºC durante 60 minutos, tiempo durante el cual se forma un

precipitado pesado. La solución se clarifica por medio de centrifugación continua. Las proteínas (A05, A12 y A22) se purifican por el uso de dos pasos cromatográficos seguidos por un intercambio de tampones final. El pH del concentrado se ajusta hasta 5,5 y se carga en una columna GigaCap-S (CEX). La proteína se une a la resina y posteriormente se eluye por el uso de un gradiente de cloruro de sodio. A lo reunido de la columna de CEX se agrega citrato de sodio hasta una concentración final de 1,5 M, y la solución se carga en una columna Phenil-650M (HIC). La proteína se une a la resina y posteriormente se eluye por el uso de un paso de gradiente de citrato de sodio. La reunión de HIC que contiene la proteína purificada se intercambia con el tampón de principio activo final por medio de diafiltración. Se utiliza un cassette de ultrafiltración de acetato de celulosa regenerado de 5 kD. La concentración de proteína se dirige a 1,5 a 2,0 mg/ml. El retenido diafiltrado se filtra a través de un filtro de 0,2 micrones antes de rellenarse en las botellas de almacenamiento. El principio activo se almacena a -70ºC.

Ejemplo 17: Ensayo bactericida en suero

Se examinaron las titulaciones de anticuerpo funcional por medio de un ensayo bactericida en suero (SBA) contra cepas de *Neisseria meningitidis* serogrupo B de tipo salvaje o manipuladas que expresan fHBP ya sea con secuencias homólogas o heterólogas a aquellas contenidas en la vacuna. Se determinaron anticuerpos bactericidas en suero en conejos inmunizados con vacunas de rP2086 por el uso de SBA con un complemento humano. Los sueros inmunes de conejo se inactivaron por calor para eliminar la actividad de complemento intrínseca y posteriormente se diluyeron en forma serial dos veces en PBS de Dulbecco con una placa de microtitulación de 96 pocillos Ca2+ y Mg2+ (D-PBS) para probar la actividad bactericida en suero contra cepas de *N. meningitidis*. Para estudios de combinación con cepas manipuladas, los sueros de interés se mezclaron en una proporción 1:1 antes de la dilución serial descripta con anterioridad, entonces la concentración efectiva de cada componente era la mitad cuando cada una se probaba en forma individual. Las bacterias utilizadas en el ensayo se cultivaron en medios GC suplementados con suplemento de Kellogg (GCK) y se monitorearon por medio de densidad óptica a 650 nm. Las bacterias se cultivaron para su uso en el ensayo en un OD_{650} final de 0,50 a 0,55, se diluyeron en D-PBS y se agregaron 1000 a 3000 CFU a la mezcla de ensayo. Se utilizó suero humano sin actividad bactericida detectable como la fuente de complemento exógena. Las fuentes de complemento se probaron

por su adecuabilidad contra cada cepa de prueba individual. Para las cepas isogénicas, se identificó un único suero humano y se calificó para los SBA contra todas las cepas isogénicas. Se utilizó una fuente de complemento únicamente si el número de bacterias que sobrevivían en los controles sin sueros inmunes agregados era >75%. Después de una incubación de 30 minutos a 37ºC con 5% de CO_2 y una agitación de 700 rpm en un agitador, se agregó D-PBS a la mezcla de reacción y se transfirieron alícuotas a placas de microfiltros prellenadas con 50% de medios GCK para las cepas de tipo salvaje y 100% de medio GCK para las cepas manipuladas. Las placas de microfiltros se filtraron, se incubaron hasta el día siguiente a 37ºC con 5% de CO_2 y se tiñeron y cuantificaron las microcolonias. Las titulaciones de bactericidas en suero se definieron como la dilución en suero recíproca interpolada que dio un 50% de reducción en las CFU en comparación con las CFU en pocillos de control sin sueros inmunes. Se estableció la susceptibilidad a la eliminación por medio de sueros inmunes anti-rP2086 si había un aumento de 4 veces o más en la titulación de SBA para sueros inmunes anti-rP2086 en comparación con los sueros preinmunes correspondientes. Los sueros que eran negativos contra la cepa de ensayo en la dilución de inicio se asignaron una titulación de la mitad del límite de detección para el ensayo.

Ejemplo 18: Inmunogenicidad de variantes no lipidadas de proteínas rP2086 de la subfamilia A

Se utilizaron conejos hembra blancos de Nueva Zelanda (de 2,5 a 3,5 kg) obtenidos de Charles River (Canadá) en dos estudios. Para el primer estudio, se inmunizaron grupos de 3 conejos con ya sea 30 mcg o 3 mcg cada uno de ya sea una formulación fHBP de A05 lipidada o de A05 no lipidada. Para el segundo estudio, se inmunizaron cinco conejos por grupo por vía intramuscular en la pata trasera derecha con variantes rP2086A a 20 µg/ml adyuvada con 500 µg/ml de AlPO4 (0,5ml/dosis/dos sitios). Los animales se vacunaron en las semanas 0, 4 y 9, se les extrajo sangre en las semanas 0 y 6 y se desangraron en la semana 10. Las titulaciones de anticuerpo bactericida específico LP2086 se determinaron en las semanas 0, 6 y 10.

El objetivo de estos estudios fue imitar las las respuestas reducidas que se observan para poblaciones inmunológicamente naïf tales como infantes. Primero se comparó una dosificación baja y una alta (30 vs 3 mcg por antígeno por dosis) de vacunas que contenían ya sea A05 lipidado (SEQ ID NO: 13) o A05 no lipidado (SEQ ID NO: 55) (Tablas 15 A y 15B). Las dosificaciones bajas se utilizaron de manera tal

que se pudieran discernir las diferencias en la tasa de respuesta entre cada vacuna. Se llevó a cabo un análisis SBA por el uso de dos conjuntos de cepas. El primer conjunto consistió en cepas de tipo salvaje que habían provocado una enfermedad invasiva. El segundo era un conjunto de cepas genéticamente manipuladas que tenían el mismo antecedente de cepas y difería únicamente por la secuencia del fHBP que se expresaba de acuerdo con lo presentado a continuación: la cepa PMB3556 de *N. menigitidis*, que expresa una variante B24 de fHBP, se manipuló de manera tal que su gen *fhbp* endógeno se reemplazó con genes que codifican otras variantes fHBP. Los constructos se diseñaron de manera tal que únicamente la región que codifica el ORF se "intercambió" y el antecedente genético que lo rodeaba se dejó intacto. Por lo tanto, el análisis de SBA por el uso de este conjunto de cepas permitió la evaluación de reactividad contra diferentes proteínas fHBP de la subfamilia A expresadas en el mismo nivel y en el mismo antecedente genético por el uso de una fuente de complemento humano. Todas las cepas tenían niveles de expresión de fHBP que estaba por encima del umbral identificado por Jiang et al (2010). De acuerdo con lo mostrado en las Tablas 15A y 15B, tanto los niveles de dosis altas y bajas de la vacuna que contiene A05 lipidado obtuvo una amplia protección a lo largo de las variantes de la subfamilia A genéticamente diversas, mientras que se observaron respuestas reducidas en ambas dosis para la vacuna que contiene la variante no lipidada A05. Por lo tanto, esta comparación de lado a lado reveló que, si bien la variante no lipidada A05 es protectora en forma cruzada a lo largo de la cepas expresoras de la subfamilia A, no es tan inmunogénica como la variante lipidada que es más probable que forme una configuración nativa (Tablas 15A y 15B).

Para el estudio posterior, el nivel de dosis se elevó a 10 mcg por variante no lipidada de la subfamilia A para evaluar casa uno por su potencial para proporcionar una amplia cobertura contra las cepas de la subfamilia A. El análisis de SBA revela que en estos sueros de nivel de dosis elevados de conejos inmunizados con variantes fHBP A05 (SEQ ID NO: 55), A62 (SEQ ID NO: 71), A12 (SEQ ID NO: 66) y A22 (SEQ ID NO: 68) no lipidadas todos indujeron titulaciones de cepas de tipo salvaje que expresan tanto variantes homólogas como heterólogas de la subfamilia A, lo que indica que todos eran protectores en forma cruzada en esta dosis baja dentro de la subfamilia A. Por lo tanto, se ha observado que la vacuna N2C1 (A05) podría generar anticuerpos que podrían eliminar las cepas de las variantes N1C2 (A22) y N2C2 (A12) y asimismo las vacunas de estos otros grupos podrían eliminar las cepas con variantes opuestas. Bajo estas condiciones, se observó que las variantes A05 y A62 indujeron

las tasas de respuesta de SBA más altas a lo largo de las cepas (Tabla 16). Por consiguiente, esto muestra un efecto protector a lo largo de estas variantes.

Tabla 15A – Formulación A05 lipidada

			Titulaciones de SBA Geométricas Medias					
			Formulación de A05 Lipidada					
			Dosis de 30 mcg			Dosis de 3 mcg		
	Variante fHBP	nombre de la cepa	Pre	PD3	Aumento ≥4	pre	PD3	Aumento ≥4
Cepas de tipo salvaje	A05	PMB1745	2	697	3	2	382	3
	A12	PMB258	5	406	3	2	99	3
	A22	PMB3570	2	956	3	3	185	3
	A62	PMB3037	2	959	3	2	50	3
Cepas isogénicas	A05	RD3040-A05	102	3424	3	38	583	3
	A12	RD3044-A12	15	1233	3	8	183	3
	A22	RD3042-A22	24	3289	3	6	582	3
	A29	RD3043-A29	63	4086	3	19	1359	3

Tabla 15B – Formulación A05 no lipidada

			Titulaciones de SBA Geométricas Medias					
			Formulación de A05 Lipidada					
			Dosis de 30 mcg			Dosis de 3 mcg		
	Variante fHBP	Nombre de la cepa	pre	PD3	Aumento ≥4	pre	PD3	Aumento ≥4
Cepas de tipo salvaje	A05	PMB1745	2	1182	3	2	281	3
	A12	PMB258	5	31	2	6	23	1
	A22	PMB3570	2	76	3	2	11	2
	A62	PMB3037	2	35	2	2	2	0
Cepas isogénicas	A05	RD3040-A05	95	258	0	78	134	1
	A12	RD3044-A12	34	228	2	50	105	1
	A22	RD3042-A22	24	221	2	23	85	1
	A29	RD3043-A29	36	326	3	52	267	2

Tablas 15A y 15B. Las Titulaciones de SBA Medias Geométricas contra cepas de *N. meningitidis* grupo B de sueros tomadas antes y después (PD3 = 10 semanas) de la inmunización de los conejos (n = 3) con vacunas ya sea de 30 o 3 mcg que contienen A05 lipidado o no lipidado. Las filas superiores (marcadas como “cepas de tipo salvaje”) de las Tablas 15A y 15B sintetizan la actividad contra aislados clínicos. Las filas inferiores (marcadas como “cepas isogénicas”) de las Tablas 15A y 15B sintetizan la actividad contra un conjunto de cepas isogénicas que se manipularon de la cepa de *N. meningitidis* parental (PMB3556) de manera tal que la ORF completa de su fHBP endógeno se reemplazó ya sea con variantes A05 (SEQ ID NO: 13), A22 (SEQ ID NO: 15), A29 (SEQ ID NO: 74) o A12 (SEQ ID NO: 14).

	Porcentaje de Respondedores con un aumento >4 veces				
vacuna	**A05**	**A62**	**A12**	**A22**	**Promedio**
A62	**100**	**100**	**60**	**60**	80
A05	**80**	**80**	**60**	**80**	75
A12	**60**	**80**	**60**	**60**	65
A22	**60**	**60**	**40**	**40**	50

Tabla 16. El porcentaje de respondedores que demuestra un aumento de al menos 4 veces en los niveles de GMT SBA sobre los antecedentes de los sueros de 10 semanas tomados de conejos inmunizados con 10 mcg de variantes fHBP no lipidadas de la subfamilia A contra cepas que expresan las variantes fHBP A05, A62, A12 o A22.

También se observó una protección cruzada para todas las variantes por el uso del conjunto de cepas isogénicas que se describe con anterioridad en la dosis aumentada de 10 mcg, con sueros de conejos inmunizados con la variante A62 (SEQ ID NO: 71) lo que demuestra la mayor reactividad cruzada, seguido por anti-sueros A05 (Tabla 17). En adición, los sueros de conejos inmunizados con la variante A62 (SEQ ID NO: 71) mostraron reactividad tanto a la cepa PMB3556 parental y la cepa B09 intercambiada (Tabla 18), lo que indica que la actividad de reactividad cruzada se extiende a las proteínas de la subfamilia B. A62 parece estar compuesta tanto por dominios de la subfamilia A (A22) como la subfamilia B (B09) (Figura 9).

	Titulaciones de SBA Geométricas Medias vs. Conjunto de Cepas isogénicas											
	RD3040-A05		RD3042-A22		RD3043-A29		RD3044-A12		PMB3556 (B24 padre)		KA3011	
Vacuna	pre	PD3	pre	PD3	pre	PD3	Pre	PD3	pre	PD3	pre	PD3
A62	17	36	31	69	4	95	23	45	44	109	4	2
A05	7	67	5	64	20	132	16	58	34	40	3	2
A12	12	40	8	34	3	40	25	149	27	46	3	2
A22	9	46	13	36	5	30	13	38	28	34	4	2

	Porcentaje de Respondedores (aumento ≥4 veces)					
Vacuna	RD3040-A05	RD3042-A22	RD3043-A29	RD3044-A12	PMB3556	KA3011
A62	40	80	100	40	40	0
A05	80	80	60	40	0	0
A12	40	40	60	60	20	0
A22	80	40	60	60	20	0

Tabla 17. Se manipularon cepas isogénicas “intercambiadas” de la cepa *N.*

meningitidis padre (PMB3556) de manera tal que la ORF completa de su fHBP endógeno (una variante B24) se reemplazó ya sea con las variantes A05 (SEQ ID NO: 13), A22 (SEQ ID NO: 15), A29 (SEQ ID NO: 74) o A12 (SEQ ID NO: 14). KA3011 es una cepa de control negativo (es decir, el PMB3556 padre cuyo gen *fhbp* se ha suprimido). Las Titulaciones de SBA Geométricas Medias (n = 5) de sueros (tomadas antes o 10 semanas después de la inmunización de conejos con tres dosis de 10 mcg de variantes fHBP no lipidadas de la subfamilia A) contra estas cepas se muestra en las filas superiores. El porcentaje de respondedores que demuestra un aumento de al menos 4 veces en respuesta por sobre los antecedentes se muestra en las filas inferiores.

	Titulaciones de SBA Geométricas Medias contra cepas isogénicas de la subfamilia B					
	PMB3556 (padre)			RD30337-B09		
Vacuna	pre	PD3	% de respondedores (aumento >4 veces)	pre	PD3	% de respondedores (aumento >4 veces)
A62	44	109	60	31	163	60
A05	34	40	0	32	28	0
A12	27	46	20	19	23	20
A22	28	34	0	29	30	0

Tabla 18. Titulaciones de SBA Geométricas Medias de sueros (tomadas antes o 10 semanas después de la inmunización de conejos (n = 5) con 10 mcg de proteínas de la subfamilia A no lipidadas (A62 (SEQ ID NO: 71); A05 (SEQ ID NO: 55); A12 (SEQ ID NO: 66); A22 (SEQ ID NO: 68)) contra dos cepas isogénicas de la subfamilia B.

Ejemplo 19: Evaluación del efecto de la combinación de sueros elevados contra proteínas no lipidadas de la subfamilia A en SBA

Se evaluaron combinaciones de suero para probar el efecto en la amplitud de la cobertura. Se probaron suero pareados antes vs después de la vacunación para confirmar que no existía una eliminación no específica inducida como un resultado de la combinación del suero. Se calculó el aumento de GM veces para los sueros individuales y para las combinaciones de suero a lo largo de las 4 cepas isogénicas que representaban diversidad dentro de la subfamilia A. Los aumentos de las veces se detectaron para algunas de las combinaciones probadas, lo que proporciona la evidencia de que la amplitud de la cobertura se puede aumentar por medio de la inclusión de más variantes de la subfamilia A (Tabla 19). Las combinaciones óptimas parecen ser A05 (SEQ ID NO: 55) con A62 (SEQ ID NO: 71) o A62 (SEQ ID NO: 71)

con A12 (SEQ ID NO: 66) (Tabla 20).

	Titulación de BC50								
	A05			A12			A62		
	AQ508-5			AQ509-4			AQ507-5		
Cepa	Sem. 0	Sem. 10	Aumento de veces	Sem. 0	Sem. 10	Aumento de veces	Sem. 0	Sem. 10	Aumento de veces
RD3040-A05	2	98	49	2	65	33	3	14	5
RD3042-A22	2	116	58	2	94	47	2	81	40
RD3043-A29	3	368	123	2	198	99	5	54	11
RD3044-A12	2	37	19	3	486	162	3	45	15
Aumento de veces GM			50			70			13
KA3011	2	2	1	2	2	1	9	5	1

	Titulación de BC50								
	A05 + A12			A05 + A62			A12 + A62		
	AQ508-5 + AQ509-4			AQ508-5 + AQ507-5			AQ509-4 + AQ507-5		
Cepa	Sem. 0	Sem. 10	Aumento de veces	Sem. 0	Sem. 10	Aumento de veces	Sem. 0	Sem. 10	Aumento de veces
RD3040-A05	7	170	24	8	107	13	2	97	49
RD3042-A22	6	3418	570	6	160	27	2	181	91
RD3043-A29	2	509	255	7	1181	169	6	478	80
RD3044-A12	8	335	42	5	1302	260	7	3707	530
GM aumento de veces			110			63			117
KA3011	13	2	0	2	5	3	7	5	1

Tabla 19. Las Titulaciones de SBA de sueros delos respondedores más altos de cada grupo de vacuna se probaron nuevamente contra el conjunto de cepas isogénicas de acuerdo con lo mostrado en la Tabla 17. Los sueros se probaron en mezclas uno a uno para determinar la extensión de actividad sinergística.

Combinación	Aumento de veces para Vacuna Combinación de vs Monovalente		
	A05	A12	A62
A05 (SEQ ID NO: 55) + A12(SEQ ID NO: 66)	2,2	1,6	
A05 (SEQ ID NO: 55) + A62 (SEQ ID NO: 71)	1,3		4,8
A12 (SEQ ID NO: 66)+ A62 (SEQ ID NO: 71)		1,7	8,9

Tabla 20. El aumento de veces para los sueros probados en combinación en comparación con cada uno probado por sí solo (calculado de la Tabla 19).

Los resultados presentados con anterioridad en los Ejemplos 18 y 19 muestran que las proteínas no lipidado de la subfamilia A son inmunogénicos y pueden proporcionar protección contra la infección de cepas de *N. meningitidis* que portan variantes ya sean homólogas o heterólogas. Los datos presentados en la presente ilustran que las variantes no lipidadas de la subfamilia A seleccionados retienen su inmunogenicidad y proporcionan una protección cruzada contra cepas heterólogas, si bien estas respuestas son menores que las variantes lipidadas. También se ha demostrado que el antígeno rP2086A62 (SEQ ID NO: 71), que tiene una similitud de secuencia con la subfamilia B (véase, por ejemplo, la Figura 9), puede proteger a lo largo de las subfamilias dado que la vacuna A62 (SEQ ID NO: 71) puede eliminar las cepas que expresan las variantes B09 o B24 de la subfamilia B).

Los datos presentados con anterioridad muestran que no únicamente son las variantes no lipidadas de la subfamilia A capaces del tipo de sinergia observada con las combinaciones de fHBP lipidado, sino también que pueden proporcionar una cobertura contra variantes de la subfamilia B.

Ejemplo 20: Evaluación de inmunogenicidad de la combinación de proteínas de unión al factor H y vacuna conjugada meningocócica tetravalente en conejos blancos de Nueva Zelanda

El estudio se llevó a cabo en conejos blancos de Nueva Zelanda en el intervalo de 2,5 a 3,5 kg obtenidos de Charles River, Canadá (Tabla 21). Antes de ingresar al estudio, 55 conejos se pre-visualizaron por anticuerpos existentes por el uso de ELISA de célula completa contra las cepas A05 y B02. Después de la visualización, los conejos con titulaciones de anticuerpo relativamente bajas (titulaciones de IgG específicas <350) se vacunaron por vía intramuscular en las patas traseras, 0,5 ml por sitio (1,0ml por dosis, véase la Tabla 22) en las semanas 0, 4, y 9. Había tres conejos por grupo. Se les extrajo sangre a los conejos en las semanas 0, 4, 6, 9, y se desangraron en la semana 10. Se prepararon las muestras de suero y las muestras de suero de la semana 0 y 10 se analizaron por medio de SBA. Se prepararon la vacuna conjugada meningocócica (MENVEO®, vacuna conjugada meningocócica CRM_{197} oligosacáridos de difteria (Grupos A, C, Y y W-135), Novartis), las variantes bivalentes rLP2086 y tetravalentes no lipidadas y sus combinaciones de acuerdo con las Tablas 23 a 26.

Tabla 21:Conejos Utilizados en Este Estudio

Especie:	Conejo
Cepa:	Blanco de Nueva Zelanda
Fuente:[a]	Charles River Laboratory
N.° de Animales Por Grupo:	3
N.° Total de Animales :	30
Edad y Sexo:	Machos
Peso:	2,5 a 3,5 kg

[a] Los conejos se mantuvieron de acuerdo con los establecido en las directrices del Institutional Animal Care and Use Committee.

El diseño del estudio se muestra en la Tabla 22.

Tabla 22: Diseño Experimental

Grupo	# de Conejo	Inmunógeno	Adyuvante	Vac. (sem.)	Prep. de Suero
1	3	1 Dosificación Humana de MENVEO/dosis 1,0 ml/2 sitios	Ninguno	0, 4, 9	Sem. 0, 4, 6, 9 Desang.: Sem. 10
2	3	1:10 Dosificación Humana de MENVEO/dosis 1,0 ml/2 sitios	Ninguno	0, 4, 9	Sem. 0, 4, 6, 9 Desang.: Sem. 10
3	3	1 Dosificación Humana de MENVEO + 30 µg de rLP2086-A (A05 (SEQ ID NO: 13)) + 30 µg de rLP2086-B (B01 (SEQ ID NO: 58))/dosis 1,0 ml/2 sitios	$AlPO_4$ 250 µg/dosis/1,0ml	0, 4, 9	Sem. 0, 4, 6, 9 Desang.: Sem. 10
4	3	1:10 Dosificación Humana de MENVEO + 3 µg de rLP2086-A (A05 (SEQ ID NO: 13)) + 3 µg de rLP2086-B (B01 (SEQ ID NO: 58))/dosis 1,0 ml/2 sitios	$AlPO_4$ 250 µg/dosis/1,0ml	0, 4, 9	Sem. 0, 4, 6, 9 Desang.: Sem. 10
5	3	30 µg de rLP2086-A (A05 (SEQ ID NO: 13))+ 30 µg de rLP2086-B (B01 (SEQ ID NO: 58)/dosis 1,0 ml/2 sitios	$AlPO_4$ 250 µg/dosis/1,0ml	0, 4, 9	Sem. 0, 4, 6, 9 Desang.: Sem. 10
6	3	3 µg de rLP2086-A (A05 (SEQ ID NO: 13))+ 3 µg de rLP2086-B (B01 (SEQ ID NO: 58)/dosis 1,0 ml/2 sitios	$AlPO_4$ 250 µg/dosis/1,0ml	0, 4, 9	Sem. 0, 4, 6, 9 Desang.: Sem. 10
7	3	rP2086-A05 No lipidado (SEQ ID NO: 55), B09 (SEQ ID NO: 49), B22 (SEQ ID NO: 75), y B44 (SEQ ID NO: 44), 30 µg cada uno/dosis 1,0 ml/2 sitios	$AlPO_4$ 250 µg/dosis/1,0ml	0, 4, 9	Sem. 0, 4, 6, 9 Desang.: Sem. 10

8	3	rP2086-A05, B09, B22, y B44 No lipidados, 3 µg cada uno/dosis 1,0 ml/2 sitios	$AlPO_4$ 250 µg/dosis/1,0ml	0, 4, 9	Sem. 0, 4, 6, 9 Desang.: Sem. 10
9	3	1 Dosificación Humana de MENVEO + rP2086-A05, B09, B22, y B44 No lipidados, 30 µg cada uno/dosis 1,0 ml/2 sitios	$AlPO_4$ 250 µg/dosis/1,0ml	0, 4, 9	Sem. 0, 4, 6, 9 Desang.: Sem. 10
10	3	1:10 Dosificación Humana de MENVEO + rP2086-A05, B09, B22, y B44 No lipidados, 3 µg cada uno/dosis 1,0 ml/2 sitios	$AlPO_4$ 250 µg/dosis/1,0ml	0, 4, 9	Sem. 0, 4, 6, 9 Desang.: Sem. 10

Síntesis de Formulaciones

Tabla 23: Formulaciones para Inmunización

Material	Función	Formulación	Presentación/ Apariencia	Cantidad Proporcionada para 3 dosis
MENVEO® vacuna meningocócica conjugada CRM_{197} de oligosacárido de difteria (Grupos A, C, Y y W-135), Novartis	Activo	Producto de Novartis que contiene grupos Meningocócicos A, C, Y y W-135	Líq. A: Pastel blando y blanco Líquido C, Y, W-135: Solución clara e incolora	3 x 15 dosis
rLP2086-A (A05 (SEQ ID NO: 13)), rLP2086-B (B01 (SEQ ID NO: 58))	Activo	rLP2086 de la subfamilia A y B a 120 µg/ml por proteína en Histidina pH 6,0, aprox. 0,005% PS80 con 0,5 mg/ml Al de $AlPO_4$	Suspensión turbia homogénea blanca a blancuzca	3 x 15 jeringas (0,57ml volumen de rellenado)
L44857-50 MnB tetravalente no lipidada	Activo	A05 (SEQ ID NO: 55), B44 (SEQ ID NO: 44), B22 (SEQ ID NO: 75), y B09 (SEQ ID NO: 49) a 0,6 mg/ml formulada en 10 mM de tampón de Histidina, pH 6,5 con 0,01% de PS80, 4,5% de Trehalosa, y WFI	Liofilizado; pastel blando y blanco	3 x 15 viales (0,7ml volumen reconst.)
$AlPO_4$	Adyuvante	$AlPO_4$, 60 mM de NaCl, WFI	Suspensión turbia homogénea blanca a blancuzca	30 ml 0,5 mg/ml en 3 viales de vidrio 30 ml 0,25 mg/ml en 3 viales de vidrio
60 mM de Solución Salina	Diluyente	NA	Solución clara e incolora	3 x 20 viales (1,0 ml volumen de rellenado)

Tabla 24: Excipientes e Información del Contenedor/Cierre			
Formulación	**N.° de Lote**	**Fuente**	**Excipientes**
MENVEO®	Componente Conjugado Líquido MenCYW-135 (091101) Componente Conjugado Liofilizado MenA (029011)	Novartis	La vacuna no contiene conservante o adyuvante alguno. Cada dosis de vacuna contiene 10 µg de oligosacárido MenA, 5 µg de cada uno de oligosacáridos MenC, MenY y MenW135 y 32,7 a 64,1 µg de proteína CRM_{197}. Se estima que el formaldehído residual por dosis no es mayor que 0,30 µg. (Anteriormente Desconocido).
rLP2086-A (A05 (SEQ ID NO: 13)), rLP2086-B (B01 (SEQ ID NO: 58))	962-UPD-09-007 v1,0	CSMD, Pfizer Pearl River, NY	Histidina pH 6,0, aprox. 0,005% de PS80, 0,5 mg/ml de Al de $AlPO_4$
MnB no lipidado tetravalente L44857-50	rPA05 (SEQ ID NO: 55) (L35408-140), rPB44(SEQ ID NO: 44) (L37024-36A), rPB22 (SEQ ID NO: 75) (L37024-61), rPB09 (SEQ ID NO: 49)(L43930-80)	Formulation Development, Pearl River, NY	Tampón de histidina, pH 6,5 (L44130-129), Polisorbato 80 (L44130-127), Trehalosa (L44863-68), WFI (B|Braun J0A012)
$AlPO_4$	0,5 mg/ml: L44863-86A 0,25 mg/ml: L44863-86B	Pfizer Pearl River, NY	$AlPO_4$ a granel H000000606-D86864M 0,9% de solución salina (B/Broun J0A017), WFI (B/Broun J0A012)
60 mM de Solución Salina	962-UPD-10-004	CSMD, Pfizer Pearl River, NY	N/A

Contenedor/Cierre para MnB Tetravalente:

Viales: vidrio de tipo 1 de 2 ml, West Pharmaceuticals

Tapones: Tapones de viales de 13 mm para liofilización, butilo gris, recubierto con Flurotec (WPS V2-F451W 4432/50 Gray B2-TR Westar® RU Verisure Ready-Pack), West Pharmaceuticals

Contenedor/Cierre para 60 mM de Solución Salina:

Viales: vidrio de tipo 1 de 2 ml, Schott (Vendor Part #: 8M002PD-CS)

Tapones: 13 mm Daikyo D777-1, S2-F451, B2-40 Westar RS West, (Parte del Vendedor #: 19560180)

Contenedor/Cierre para Soluciones de $AlPO_4$:

Viales: Viales Vacíos Estériles, Tamaño 30 ml-20 mm, Tapones incluidos, Allergy Laboratories, N.° de Lote SEV070708A

TABLA 25. ANALISIS DE DATOS

Tabla 25: Pruebas Analíticas de Tetra-Antígeno no lipidado MnB Lote L44857-50

Prueba	B22, B09, A05, B44 Blancos (µg/ml)	Concentración de B22 (µg/ml)	Concentración de B09 (µg/ml)	Concentración de A05 (µg/ml)	Concentración de B44 (µg/ml)
IEX-HPLC	60/60/60/60	59,7	61,9	64,1	63,0
pH	6,5	6,52			
Apariencia	Solución clara e incolora	Lyo: Pastel blando y blanco. Reconstitución (w/ 60mM de NaCl): Solución clara e incolora			
Humedad	< 3%	0,60 %			

La formulación liofilizada se reconstituyó con Fase Móvil A durante la cuantificación de B22, B09, A05, y B44 por medio de IEX-HPLC; y con 60 mM de diluyente NaCl para el pH y la apariencia. Se utilizó el método de Karl-Fischer (ICH) para medir la humedad (por el uso de metanol para reconstituir las formulaciones liofilizadas).

Tabla 26: pH y Apariencia de Soluciones de $AlPO_4$

Muestra	N.° de Lote	pH	Apariencia
$AlPO_4$ @ 0,5 mg/ml	L44863-86ª	5,95	Suspensión turbia, blanca a blancuzca
$AlPO_4$ @ 0,25 mg/ml	L44863-86B	5,91	Suspensión turbia, blanca a blancuzca

La proteína tetravalente no lipidada (B22, B09, A05 y B44) se monitoreó por su estabilidad durante 6 horas a 2 a 8 ^{0}C tras la combinación con MENVEO®.

Ejemplo 21: Ensayo bactericida en suero (SBA)

Se llevó a cabo un ensayo bactericida en suero (SBA) basado en microcolonias contra múltiples cepas meningocócicas del serogrupo B, C e Y (Tabla 27) en muestras

de suero individuales. Los sueros humanos de donantes se calificaron como la fuente de complemento para la cepa probada en el ensayo. Se interpolaron las titulaciones bactericidas dependientes de anticuerpos mediadas por complementos y se expresaron como la recíproca de la dilución del suero de prueba que eliminó el 50% de las células meningocócicas en el ensayo. El límite de detección del ensayo fue una titulación de SBA de 4. A una titulación de SBA de <4 se le asignó número de 2. Se calculó un aumento ≥ 4 veces de las titulaciones de SBA en los sueros de la semana 10 en comparación con las titulaciones antes de la extracción y se comparó.

Tabla 27: Cepas de SBA

Serogrupo	Variante fHBP	Nombre de la cepa
B	A05	PMB1745
B	B02	PMB17
B	B09	PMB1489
B	B16	PMB2882
B	B44	PMB147
C	A68	PMB2432
C	B24	PMB2240
Y	A121	PMB3386
Y	B09	PMB3210

Ejemplo 22: Inmunogenicidad de la combinación de proteínas de unión al factor H lipidadas o no lipidadas y la vacuna conjugada en conejos blancos de Nueva Zelanda

El anticuerpo bactericida en suero es el sustituto inmunológico de protección contra la enfermedad meningocócica. Tanto la inmunización con vacunas conjugadas tetravalentes de rfHBP lipidadas, no lipidadas, solas o en combinación que obtuvieron anticuerpos bactericidas en conejos se determinaron por medio de SBA. El SBA mide el nivel de anticuerpos en una muestra de suero por medio de la imitación de la lisis bacteriana mediada por complementos que aparece en forma natural. En los seres humanos, se considera que una titulación de SBA de 1:4 es protectora; también se considera que un aumento de cuatro veces en la titulación, antes vs después de la inmunización es un respuesta inmune inmunológicamente relevante. Las muestras de suero de conejos recolectadas de las semanas 0 y 10 se analizaron por medio de SBA contra cepas de varios serogrupos meningocócicos. De acuerdo con lo mostrado en la Tabla 28 (dosis más alta) y 29 (dosis más baja), una semana después de la tercera inmunización (semana 10), las vacunas conjugadas tetravalentes únicamente

obtuvieron respuestas de SBA contra las cepas MnC y MnY probadas. Todas las otras muestras de suero exhibieron una actividad bactericida contra las cepas homólogas así como también otras cepas de prueba de la misma subfamilia fHBP al igual que en las formulaciones de vacuna. Se destaca que la inmunización con A05/B01 lipidada (SEQ ID NOs: 13 y 58, respectivamente) sola en dosis de 30 mcg cada una obtuvo los anticuerpos bactericidas más altos contra las cepas homólogas así como también contra otras cepas probadas de ambas subfamilias fHBP (Tabla 28). En forma similar, la inmunización con A05/B09/B22/B44 no lipidadas (SEQ ID NOs: 55, 49, 75, y 44, respectivamente) solas también obtuvo anticuerpos bactericidas contra las cepas de varios serogrupos meningocócicos, si bien las titulaciones de SBA fueron 3 a 15 veces menores que la vacuna bivalente lipidada (Tabla 30). Se alcanzó una tasa de respuesta de 100% (aumento ≥ 4 veces en una titulación de SBA) contra todas las cepas de varios serogrupos para fHBP lipidada, alta dosis de fHBP no lipidado y todas las combinaciones.

Tabla 28: Aumento de veces en las titulaciones de SBA contra cepas de meningococo serogrupo B, C e Y por el uso de sueros de conejos inmunizados con una combinación de dosis más alta de fHBP y vacuna conjugada

		Aumento de Veces en las Titulaciones de SBA PD3								
		Cepas de MnB					Cepas de MnC		Cepas de MnY	
VACUNA	Dosis	A05	B02	B09	B16	B44	A68	B24	A121	B09
MENVEO	1 hu dosis	1	2	1	1	1	244	53	708	226
MENVEO/ A05/B01 lipidada	1 hu dosis, proteínas: 30 mcg cada uno	349	871	279	806	2048	1592	401	1037	894
A05/B01 lipidada	30 mcg cada uno	591	624	745	842	1955	1926	344	595	905
A05/B09/B22/B44 no lipidada	30 mcg cada uno	39	105	192	300	391	61	137	52	148
MENVEO/A05/B09/ B22/B44 no lipidado	1 hu dosis, proteínas: 30 mcg cada uno	34	98	108	113	178	219	125	299	135

Los sueros de conejos antes de la extracción no mostraron actividad bactericida preexistente contra las cepas probadas. Los conejos NZW (n=3) se

vacunaron en las semanas 0, 4 y 8 con 0,5 ml de vacuna, por vía i.m.; datos de la Sem. 10.

Tabla 29: Aumento de veces en las titulaciones de SBA contra cepas de meningococo serogrupo B, C e Y por el uso de sueros de conejos inmunizados con una combinación de dosis menor de fHBP y vacuna conjugada

		Aumento de Veces en las Titulaciones de SBA PD3								
		Cepas de MnB					Cepas de MnC		Cepas de MnY	
VACUNA	Dosis	A05	B02	B09	B16	B44	A68	B24	A121	B09
MENVEO	1:10 hu dosis	1	1	2	1	1	49	24	81	143
MENVEO/ A05/B01 lipidada	1:10 hu dosis, proteínas: 3 mcg cada uno	191	140	124	336	926	940	172	560	366
A05/B01 lipidada	3 mcg cada uno	142	164	440	246	834	476	162	515	294
A05/B09/B22/B44 no lipidado	3 mcg cada uno	6	22	29	22	40	34	39	16	25
MENVEO/ A05/B09/B22/B44 no lipidado	1:10 hu dosis, proteínas: 3 mcg cada uno	10	52	76	60	158	102	100	122	

Los sueros de conejos antes de la extracción no mostraron actividad bactericida preexistente contra las cepas probadas. Los conejos NZW (n=3) se vacunaron en las semanas 0, 4 y 8 con 0,5 ml de vacuna, por vía i.m.; datos de la Sem. 10

Tabla 30: Tasas de respuesta de SBA contra cepas de meningococo serogrupo B, C e Y por el uso de sueros de conejos inmunizados con una combinación de fHBP y vacuna conjugada

		Respondedores PD3 (≥4 aumento de veces)								
		Cepas de MnB					Cepas de MnC		Cepas de MnY	
VACUNA	Dosis	A05	B02	B09	B16	B44	A68	B24	A121	B09
MENVEO	1 hu dosis	0	0	0	0	0	100	100	100	100
MENVEO	1:10 hu dosis	0	0	0	0	0	100	100	100	100
MENVEO/ A05/B01 lipidada	1 hu dosis, proteínas: 30 µg cada uno	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MENVEO/ A05/B01 lipidada	1:10 hu dosis, proteínas: 3 µg cada uno	100	100	100	100	100	100	100	100	100
A05/B01 lipidada	30 µg cada uno	100	100	100	100	100	100	100	100	100

A05/B01 lipidada	3 µg cada uno	100	100	100	100	100	100	100	100	100
A05/B09/B22/B44 no lipidada	30 µg cada uno	100	100	100	100	100	100	100	100	100
A05/B09/B22/B44 no lipidada	3 µg cada uno	67	67	67	67	100	67	100	67	100
MENVEO/ A05/B09/B22/B44 no lipidada	1 hu dosis, proteínas: 30 µg cada uno	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MENVEO/no lipidado A05/B09/B22/B44	1:10 hu dosis, proteínas: 3 µg cada uno	67	100	100	100	100	100	100	100	100

Los conejos NZQ (n=3) se vacunaron en las semanas 0, 4 y 8 con 0,5 ml de vacuna, por vía i.m.; datos de la Sem. 10

El fHBP lipidado obtuvo titulaciones de SBA más altas que el fHBP no lipidado.

El fHBP lipidado a 30 mcg cada uno por dosis obtuvo titulaciones de SBA 3 a 15 veces más altas que todas las cepas B, C e Y meningocócicas probadas. El fHBP no lipidado a 30 mcg cada uno por dosis obtuvo titulaciones de SBA 4 a 23 veces más altas que todas las cepas meningocócicas B, C e Y probadas (Tablas 28 y 29).

La titulación de dosis se alcanzó con los fHBP, la vacuna conjugada o las combinaciones

Con una dosis más alta de vacuna conjugado, los fHBP o sus combinaciones aumentaron las respuestas de SBA que con una dosis más baja (Tablas 28 a 30). La única dosis humana de la vacuna conjugada obtuvo titulaciones de SBA 2 a 8 veces más altas contra las cepas meningocócicas C e Y que un décimo de la dosis de la vacuna conjugada. El fHBP lipidado a 30 mcg cada uno por dosis obtuvo titulaciones de SBA 2 a 4 veces más altas contra todas las cepas probadas que el de 3 mcg cada uno por dosis. El fHBP no lipidado a 30 mcg cada uno por dosis obtuvo titulaciones de SBA 4 a 15 veces más altas contra todas las cepas de los serogrupos meningocócicos B, C e Y que el de 3 mcg cada uno por dosis.

Respuestas de SBA sinérgicas por medio de la combinación de fHBP y vacunas conjugadas

Existe una tendencia de que las respuestas de SBA son más altas contra las cepas de los serogrupos meningocócicos C e Y cuando se utilizó la combinación de vacuna conjugada y fHBP que por el uso de cualquier componente solo, en especial con la adición de una dosis más baja de fHBP lipidado o no lipidado (Tabla 29). En el

presente estudio, se evaluó la actividad funcional contra las cepas de varios serogrupos meningocócicos por el uso de sueros de conejos blancos de Nueva Zelanda inmunizados con fHBP recombinante lipidado o no lipidado en formulación con $AlPO_4$ y la vacuna conjugada sola o en combinación. Los conejos que recibieron la vacuna conjugado obtuvieron respuestas SBA únicamente contra las cepas del serogrupo meningocócico C e Y, pero no las cepas del serogrupo B. El fHBP lipidado o no lipidado en formulación con $AlPO_4$ obtuvo anticuerpos en suero que fueron bactericidas contra las cepas de todos los serogrupos meningocócicos.

Los conejos blancos de Nueva Zelanda que recibieron tres dosis del fHBP lipidado o no lipidado en formulación con $AlPO_4$ obtuvo anticuerpos en suero que fueron bactericidas contra las cepas de los serogrupos meningocócicos B, C e Y probados. Se alcanzó una tasa de respuesta de 100% (aumento $\geq$ 4 veces en una titulación de SBA) contra todas las cepas probadas excepto el grupo no lipidado de dosis más baja.

El fHBP lipidado obtuvo mayores titulaciones de anticuerpo bactericida que las formas no lipidadas. Se observó una respuesta de dosis clara con el fHBP lipidado o no lipidado y la vacuna conjugada sola o en combinaciones.

Existe una tendencia de respuestas de SBA sinérgicas contra las cepas del serogrupo meningocócico C e Y entre la vacuna conjugada y fHBP en especial con la adición de proteínas de dosis más bajas.

Ejemplo 23: Evaluación de la inmunogenicidad de combinaciones de proteínas de unión al factor H no lipidadas en Conejos Blancos de Nueva Zelanda

Se llevaron a cabo estudios en conejos blancos de Nueva Zelanda en el intervalo de 2,5 a 3,5 kg obtenidos de Charles River, Canadá (Tabla 31). Los conejos se vacunaron por vía intramuscular en las patas traseras, 0,5 ml por sitio (1,0ml por dosis, véase la Tabla 32) en las semanas 0, 4 y 9. Los Números de ID de Secuencia para cada uno de los antígenos probados se enumeran en la Tabla 33. Había 10 conejos por grupo. Se les extrajo sangre a los conejos en las semanas 0, 6 y se desangraron en la semana 10. Se prepararon las muestras de suero y las muestras de suero de la semana 0 y 10 se analizaron por medio de SBA contra un panel de aislados de *N. meningitidis*.

Tabla 31: Conejos Utilizados en estos Estudios [a]

Especie	Conejo
Cepa	Blanco de Nueva Zelanda
Fuente	Charles River Laboratory
N.° de Animales Por Grupo	10
Sexo	Hembra
Peso	2,5-3,5 kg

[a] Los conejos se mantuvieron de acuerdo con los establecido en las directrices del Institutional Animal Care and Use Committee.

Tabla 32: Diseño del Estudio[a]

# de conejos	Variantes fHBP de composición antigénica	Lipidado	Dosis	$AlPO_4$ (0,25mg/dosis)
10	A62 + B44	No	10mcg cada uno	Si
10	A05 + A62 + B44	No	10mcg cada uno	Si
10	A05 + A62 + B09 + B44	No	10mcg cada uno	Si
10	A05 + A62 +B09 + B44	No	5mcg cada uno	Si
10	A05 + A12 +B09 + B44	No	5mcg cada uno	Si
10	A12 + A62 + B09 + B44	No	5mcg cada uno	Si
10	A05 + A12 + A62 + B09 + B44	No	5mcg cada uno	Si
10	A05 + B01	Si	10mcg cada uno	Si

[a] Los conejos se vacunaron por vía intramuscular (semanas 0, 4 y 9) y se les extrajo sangre (semanas 0, 6 y 10) para preparar muestras de suero para los análisis de SBA

Tabla 33: Variantes de Proteína fHBP *N. meningitidis* Serogrupo B Utilizadas

rP2086-A05	SEQ ID NO: 13, donde la Cys en la posición 1 está suprimida, o la SEQ ID NO: 55, por ej., codificada por la SEQ ID NO: 54
rP2086-A12	SEQ ID NO: 14, donde la Cys en la posición 1 está suprimida, o la SEQ ID NO: 66, por ej., codificada por la SEQ ID NO: 67
rP2086-A62	SEQ ID NO: 70, donde la Cys en la posición 1 está suprimida, o la SEQ ID NO: 71, por ej., codificada por la SEQ ID NO: 72
rP2086-B09	SEQ ID NO: 18, donde la Cys en la posición 1 está suprimida, o la SEQ ID NO: 49
rP2086-B44	SEQ ID NO: 21, donde la Cys en la posición 1 está suprimida, o la SEQ ID NO: 44, por ej., codificada por la SEQ ID NO: 43
rLP2086-A05	SEQ ID NO: 76
rLP2086-B01	SEQ ID NO: 58

La Tabla 34 sintetiza la respuesta inmune en conejos para mezclas de proteínas fHBP no lipidadas en comparación con la respuesta inmune para el par rLP2086-A05 y rLP2086-B01 de antígenos lipidados. Los sueros de conejos antes de la extracción por lo general no mostraron actividad bactericida preexistente contra las cepas probadas. La respuesta inmune está presentada como el porcentaje de animales en cada grupo de tratamiento que responde a las combinaciones respectivas de antígenos fHBP luego de la tercera inmunización con un aumento en la titulación de SBA $\geq$4 veces. El ensayo de SBA se llevó a cabo por el uso de cepas de *N. meningitidis* blanco que ya sea expresan variantes fHBP idénticas a el inmunógeno de vacuna (A05, A12), o cepas que expresan variantes fHBP heterólogas (A22, B16, B24). La identidad de secuencia de aminoácido comparativa de la variante fHBP A22 diverge hasta 15% de las variantes de la subfamilia A probadas. En forma similar, la identidad de secuencia de aminoácido comparativa de las variantes fHBP B16 y B24 diverge hasta 12% de las variantes de la subfamilia B incluidas como antígenos.

Tabla 34: Porcentaje de Conejos Blancos de Nueva Zelanda Vacunados con fHBP No lipidados Recombinantes que Responden con un Aumento $\geq$4 Veces en las titulaciones de SBA Después de la Dosis Tres

			% de Respondedores en PD3 con un aumento $\geq$4 Veces en titulaciones de SBA				
Inmunógeno[a]	Lipidado	Dosis por antígeno (mcg/0,5 ml)	A05	A12	A22	B16	B24
A62 + B44	No	10	nd	50	100	100	50
A05 + A62 + B44	No	10	nd	40	80	80	60
A05 + A62 + B09 + B44	No	10	nd	60	100	100	100
A05 + A62 + B09 + B44	No	5	nd	40	40	100	70
A05 + A12 + B09 + B44	No	5	60	40	60	60	60
A12 + A62 + B09 + B44	No	5	100	70	100	100	70
A05 + A12 + A62 + B09 + B44	No	5	100	100	100	100	60
A05 + B01	Si	10	nd	80	90	100	90

[a] 10 animales por grupo de tratamiento; todos los tratamientos formulados con adyuvante $AlPO_4$ (250mcg/dosis)

En aquellos grupos de conejos inmunizados con 10mcg de cada variante rP2086 de prueba, las muestras de suero de animales tratados con la combinación de A05 + A62 + B09 + B44 tuvieron la tasa de respuesta bactericida más alta. La respuesta de SBA fue reducida en cierto modo en los animales tratados únicamente con 5mcg cada uno de la misma mezcla de cuatro variantes fHBP no lipidadas. Otros grupos cuatrivalentes de los antígenos fHBP dosificados con 5mcg le fue tan bien como la combinación de A05 + A62 + B09 + B44 no lipidado. De las combinaciones cuatrivalentes probadas, las muestras de suero del grupo de tratamiento que incluyó 5mcg cada uno de variantes fHBP no lipidadas A12 + A62 + B09 + B44 tuvieron las mejores tasas de respuesta de SBA para las cepas de ensayo seleccionadas. La tasa de respuesta para la combinación no lipidada pentavalente de A05 + A12 + A62 + B09 + B44 es en cierto modo mejor que la respuesta a cualquiera de las combinaciones cuatrivalentes probadas.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 95% idéntica a la SEQ ID NO: 71, donde los primeros veinte residuos de aminoácidos de la secuencia no comprenden una cisteína.
2. El polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácido en la posición 1 a 184 de la SEQ ID NO: 71.
3. El polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polipéptido comprende al menos 6 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácido en la posición 185 a 254 de la SEQ ID NO: 71.
4. El polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polipéptido es no piruvilado.
5. El polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polipéptido es no lipidado.
6. El polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polipéptido es inmunogénico.
7. El polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, donde la secuencia de aminoácido consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 71.
8. Una composición inmunogénica que comprende el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende además un polipéptido A12.
10. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende además un polipéptido A05.
11. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende además un polipéptido B09.
12. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende además un polipéptido B44.
13. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende además un polipéptido A12, B09, y B44.
14. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende además un polipéptido A05, A12, B09, y B44.
15. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, donde cada polipéptido es no lipidado.
16. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las

reivindicaciones 9 a 14, donde cada polipéptido es no piruvilado.

17. Una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 71.

18. La secuencia de ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 17, donde la secuencia de ácido nucleico comprende la SEQ ID NO: 72.

19. Una composición inmunogénica que comprende un polipéptido ORF2086 aislado no lipidado y no piruvilado del *Neisseria meningitidis* serogrupo B, y al menos un conjugado seleccionado de:
    a) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo A
    b) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C
    c) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo W135; y
    d) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo Y.

20. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 19, donde la composición comprende al menos dos conjugados seleccionados de:
    a) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo A
    b) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C
    c) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo W135; y
    d) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo Y.

21. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 19, donde la composición comprende al menos tres conjugados seleccionados de:
    a) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo A
    b) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C
    c) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo W135; y
    d) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis*

serogrupo Y.

22. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 19, donde la composición comprende un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo A; un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C; un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo W135; y un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo Y.
23. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 19, donde el polipéptido es un polipéptido de la subfamilia A.
24. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 19, donde el polipéptido es un polipéptido de la subfamilia B.
25. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 19, donde el polipéptido es un A05 no piruvilado y no lipidado.
26. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 19, donde el polipéptido es un A12 no piruvilado y no lipidado.
27. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 19, donde el polipéptido es un A22 no piruvilado y no lipidado.
28. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 19, donde el polipéptido es un B01 no piruvilado y no lipidado.
29. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 19, donde el polipéptido es un B03 no piruvilado y no lipidado.
30. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 19, donde el polipéptido es un B09 no piruvilado y no lipidado.
31. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 19, donde el polipéptido es un B15 no piruvilado y no lipidado.
32. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 19, donde el polipéptido es un B16 no piruvilado y no lipidado.
33. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 19, donde el polipéptido es un B22 no piruvilado y no lipidado.
34. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 19, donde el polipéptido es un B24 no piruvilado y no lipidado.
35. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 19, donde el polipéptido es un B44 no piruvilado y no lipidado.
36. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 19, donde el polipéptido es un A62 no piruvilado y no lipidado.

37. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 19, donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 49, la SEQ ID NO: 55, la SEQ ID NO: 66, la SEQ ID NO: 68, la SEQ ID NO: 71, la SEQ ID NO: 76, la SEQ ID NO: 77, la SEQ ID NO: 80, la SEQ ID NO: 81, y SEQ ID NO: 75.

38. Un método para inducir una respuesta inmune contra *Neisseria meningitidis* en un mamífero, que comprende la administración al mamífero de una cantidad efectiva de una composición inmunogénica que comprende un polipéptido ORF2086 aislado no lipidado y no piruvilado del *Neisseria meningitidis* serogrupo B, y al menos un conjugado seleccionado de:

a) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo A,

b) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C,

c) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo W135, y

d) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo Y.

39. Un método para obtener un anticuerpo bactericida contra *Neisseria meningitidis* serogrupo C en un mamífero, que comprende la administración al mamífero de una cantidad efectiva de una composición inmunogénica que comprende un polipéptido ORF2086 aislado no lipidado y no piruvilado del *Neisseria meningitidis* serogrupo B.

40. El método de acuerdo con la reivindicación 39, donde el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 71 o la secuencia de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, y la SEQ ID NO: 21, donde la cisteína en la posición 1 está suprimida.

41. El método de acuerdo con la reivindicación 39, donde la composición inmunogénica además comprende al menos un conjugado seleccionado de:

a) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo A,

b) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C,

c) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo W135, y

d) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo Y.

42. Un método para obtener un anticuerpo bactericida contra *Neisseria meningitidis* serogrupo Y en un mamífero, que comprende la administración al mamífero de una cantidad efectiva de una composición inmunogénica que comprende un polipéptido ORF2086 aislado no lipidado y no piruvilado de *Neisseria meningitidis* serogrupo B.

43. El método de acuerdo con la reivindicación 42, donde el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID NO: 71 o la secuencia de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, y la SEQ ID NO: 21, donde la cisteína en la posición 1 está suprimida.

44. El método de acuerdo con la reivindicación 42, donde la composición inmunogénica además comprende al menos un conjugado seleccionado de:

a) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo A,

b) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C,

c) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo W135, y

d) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo Y.

45. Un método para obtener un anticuerpo bactericida contra *Neisseria meningitidis* en un mamífero, que comprende la administración al mamífero de una cantidad efectiva de una composición inmunogénica que comprende un polipéptido ORF2086 aislado no lipidado y no piruvilado del *Neisseria meningitidis* serogrupo B, y al menos un conjugado seleccionado de:

a) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo A,

b) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C,

c) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis*

serogrupo W135, y

d) un conjugado de un sacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo Y.

46. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 95% idéntica a la SEQ ID NO: 71.

47. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 46, donde la secuencia comprende la SEQ ID NO: 71.

48. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 46, donde el polipéptido es no lipidado.

49. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 46, donde el polipéptido es no piruvilado.

50. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 46, donde el polipéptido es no lipidado y no piruvilado.

51. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 46, donde el polipéptido es inmunogénico.

RESUMEN

En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácido que es al menos 95% idéntica a la SEQ ID NO: 71. En otro aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica que incluye un polipéptido ORF2086 aislado no lipidado y no piruvilado de *Neisseria meningitidis* serogrupo B, y al menos un sacárido capsular conjugado de un serogrupo meningocócico.

FIG. 1A

Secuencias de Ácido Nucleico de la Variante P2086 no lipidada

>Secuencias de Ácido Nucleico de la Variante A04 (SEQ ID NO: 1)

TGCAGCAGCGGAGGCGGAGGCGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGCACGGGGCTTGCCGATGCACTAACTGCGCCGCTCGACC
ATAAAGACAAAGGTTTGAAATCCCTGACATTGGAAGACTCCATTCCCCAAAACGGAACACTGACCCTGTCGGCACAAGGTGC
GGAAAAAACTTTCAAAGCCGGCGACAAAGACAACAGCCTCAACACGGGCAAACTGAAGAACGACAAAATCAGCCGCTTCGAC
TTCGTGCAAAAAATCGAAGTGGACGGACAAACCATCACACTGGCAAGCGGCGAATTTCAAATATACAAACAGGACCACTCCG
CCGTCGTTGCCCTACAGATTGAAAAAATCAACAACCCCCGACAAAATCGACAGCCTGATAAACCAACGCTCCTTCCTTGTCAG
CGGTTTGGGCGGAGAACATACCGCCTTCAACCAACTGCCCGGCGACAAAGCCGAGTATCACGGCAAAGCATTCAGCTCCGAC
GATGCCGGCGGAAAACTGACCTATACCATAGATTTTGCCGCCAAACAGGGACACGGCAAAATCGAACACCTGAAAACACCCG
AGCAAAATGTCGAGCTTGCCGCCGCCGAACTCAAAGCAGATGAAAAATCACACGCCGTCATTTTGGGCGACACGCGCTACGG
CAGCGAAGAAAAAGGCACTTACCACCTCGCCCTTTTCGGCGACCGCGCCCAAGAAATCGCCGGCTCGGCAACCGTGAAGATA
GGGGAAAAGGTTCACGAAATCGGCATCGCCGGCAAACAGTAG

>Secuencia de Ácido Nucleico de la Variante A05 (SEQ ID NO: 2)

TGCAGCAGCGGAAGCGGAAGCGGAGGCGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGCACAGGGCTTGCCGATGCACTAACTGCGCCGC
TCGACCATAAAGACAAAGGTTTGAAATCCCTGACATTGGAAGACTCCATTTCCCAAAACGGAACACTGACCCTGTCGGCACA
AGGTGCGGAAAAAACTTTCAAAGTCGGCGACAAAGACAACAGTCTCAATACAGGCAAATTGAAGAACGACAAAATCAGCCGC
TTCGACTTTGTGCAAAAAATCGAAGTGGACGGACAAACCATCACGCTGGCAAGCGGCGAATTTCAAATATACAAACAGGACC
ACTCCGCCGTCGTTGCCCTACAGATTGAAAAAATCAACAACCCCGACAAAATCGACAGCCTGATAAACCAACGCTCCTTCCT
TGTCAGCGGTTTGGGCGGAGAACATACCGCCTTCAACCAACTGCCCAGCGGCAAAGCCGAGTATCACGGCAAAGCATTCAGC
TCCGACGATGCCGGCGGAAAACTGACCTATACCATAGATTTTGCCGCCAAACAGGGACACGGCAAAATCGAACACCTGAAAA
CACCCGAGCAGAATGTCGAGCTTGCCTCCGCCGAACTCAAAGCAGATGAAAAATCACACGCCGTCATTTTGGGCGACACGCG
CTACGGCAGCGAAGAAAAAGGCACTTACCACCTCGCTCTTTTCGGCGACCGAGCCCAAGAAATCGCCGGCTCGGCAACCGTG
AAGATAAGGGAAAAGGTTCACGAAATCGGCATCGCCGGCAAACAGTAG

FIG. 1B

>Secuencias de Ácido Nucleico de la Variante A12 (SEQ ID NO: 3)

TGCAGCAGCGGAGGCGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGCGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCGCTCGACCATAAAG
ACAAAAGTTTGCAGTCTTTGACGCTGGATCAGTCCGTCAGGAAAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA
AACTTATGGAAACGGCGACAGCCTCAATACGGGCAAATTGAAGAACGACAAGGTCAGCCGCTTCGACTTTATCCGTCAAATC
GAAGTGGACGGACAAACCATCACGCTGGCAAGCGGCGAATTTCAAATATACAAACAGAACCACTCCGCCGTCGTTGCCCTAC
AGATTGAAAAAATCAACAACCCCGACAAAATCGACAGCCTGATAAACCAACGCTCCTTCCTTGTCAGCGGTTTGGGCGGAGA
ACATACCGCCTTCAACCAACTGCCTGACGGCAAAGCCGAGTATCACGGCAAAGCATTCAGCTCCGACGACCCGAACGGCAGG
CTGCACTACTCCATTGATTTTACCAAAAAACAGGGTTACGGCAGAATCGAACACCTGAAAACGCCCGAGCAGAATGTCGAGC
TTGCCTCCGCCGAACTCAAAGCAGATGAAAAATCACACGCCGTCATTTTGGGCGACACGCGCTACGGCGGCGAAGAAAAAGG
CACTTACCACCTCGCCCTTTTCGGCGACCGCGCCCAAGAAATCGCCGGCTCGGCAACCGTGAAGATAAGGGAAAAGGTTCAC
GAAATCGGCATCGCCGGCAAACAGTAG

>Secuencia de Ácido Nucleico de la Variante A12-2 (SEQ ID NO: 4)

TGCAGCAGCGGAGGGGGCGGTGTCGCCGCCGACATTGGTGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCGCTCGACCATAAAG
ACAAAAGTTTGCAGTCTTTGACGCTGGATCAGTCCGTCAGGAAAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA
AACTTATGGAAACGGCGACAGCCTCAATACGGGCAAATTGAAGAACGACAAGGTCAGCCGCTTCGACTTTATCCGTCAAATC
GAAGTGGACGGACAAACCATCACGCTGGCAAGCGGCGAATTTCAAATATACAAACAGAACCACTCCGCCGTCGTTGCCCTAC
AGATTGAAAAAATCAACAACCCCGACAAAATCGACAGCCTGATAAACCAACGCTCCTTCCTTGTCAGCGGTTTGGGCGGAGA
ACATACCGCCTTCAACCAACTGCCTGACGGCAAAGCCGAGTATCACGGCAAAGCATTCAGCTCCGACGACCCGAACGGCAGG
CTGCACTACTCCATTGATTTTACCAAAAAACAGGGTTACGGCAGAATCGAACACCTGAAAACGCCCGAGCAGAATGTCGAGC
TTGCCTCCGCCGAACTCAAAGCAGATGAAAAATCACACGCCGTCATTTTGGGCGACACGCGCTACGGCGGCGAAGAAAAAGG
CACTTACCACCTCGCCCTTTTCGGCGACCGCGCCCAAGAAATCGCCGGCTCGGCAACCGTGAAGATAAGGGAAAAGGTTCAC
GAAATCGGCATCGCCGGCAAACAGTAG

FIG. 1C

>Secuencia de Ácido Nucleico de la Variante A22 (SEQ ID NO: 5)

TGCAGCAGCGGAGGCGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGCGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCGCTCGACCATAAAG
ACAAAAGTTTGCAGTCTTTGACGCTGGATCAGTCCGTCAGGAAAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA
AACTTATGGAAACGGCGACAGCCTCAATACGGGCAAATTGAAGAACGACAAGGTCAGCCGCTTCGACTTTATCCGTCAAATC
GAAGTGGACGGGCAGCTCATTACCTTGGAGAGCGGAGAGTTCCAAATATACAAACAGGACCACTCCGCCGTCGTTGCCCTAC
AGATTGAAAAAATCAACAACCCCGACAAAATCGACAGCCTGATAAACCAACGCTCCTTCCTTGTCAGCGGTTTGGGTGGAGA
ACATACCGCCTTCAACCAACTGCCCAGCGGCAAAGCCGAGTATCACGGCAAAGCATTCAGCTCCGACGATGCTGGCGGAAAA
CTGACCTATACCATAGATTTCGCCGCCAAACAGGGACACGGCAAAATCGAACACTTGAAAACACCCGAGCAAAATGTCGAGC
TTGCCTCCGCCGAACTCAAAGCAGATGAAAAATCACACGCCGTCATTTTGGGCGACACGCGCTACGGCGGCGAAGAAAAAGG
CACTTACCACCTCGCCCTTTTCGGCGACCGCGCCCAAGAAATCGCCGGCTCGGCAACCGTGAAGATAAGGGAAAAGGTTCAC
GAAATCGGCATCGCCGGCAAACAGTAG

>Secuencia de Ácido Nucleico de la Variante B02 (SEQ ID NO: 6)

TGCAGCAGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGCGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGCGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCAC
CGCTCGACCATAAAGACAAAGGTTTGAAATCCCTGACATTGGAAGACTCCATTTCCCAAAACGGAACACTGACCCTGTCGGC
ACAAGGTGCGGAAAGAACTTTCAAAGCCGGCGACAAAGACAACAGTCTCAACACAGGCAAACTGAAGAACGACAAAATCAGC
CGCTTCGACTTTATCCGTCAAATCGAAGTGGACGGGCAGCTCATTACCTTGGAGAGCGGAGAGTTCCAAGTGTACAAACAAA
GCCATTCCGCCTTAACCGCCCTTCAGACCGAGCAAGTACAAGACTCGGAGCATTCCGGGAAGATGGTTGCGAAACGCCAGTT
CAGAATCGGCGACATAGTGGGCGAACATACATCTTTTGACAAGCTTCCCAAAGACGTCATGGCGACATATCGCGGGACGGCG
TTCGGTTCAGACGATGCCGGCGGAAAACTGACCTACACCATAGATTTCGCCGCCAAGCAGGGACACGGCAAAATCGAACATT
TGAAATCGCCTGAACTCAATGTTGACCTGGCCGCCGCCGATATCAAGCCGGATGAAAAACACCATGCCGTCATCAGCGGTTC
CGTCCTTTACAACCAAGCCGAGAAAGGCAGTTACTCTCTAGGCATCTTTGGCGGGCAAGCCCAGGAAGTTGCCGGCAGCGCG
GAAGTGGAAACCGCAAACGGCATACGCCATATCGGTCTTGCCGCCAAGCAATAA

FIG. 1D

>Secuencia de Ácido Nucleico de la Variante B03 (SEQ ID NO: 7)

TGCAGCAGCGGAGGCGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGCGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCGCTCGACCATAAAG
ACAAAAGTTTGCAGTCTTTGACGCTGGATCAGTCCGTCAGGAAAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA
AACTTATGGAAACGGCGACAGCCTTAATACGGGCAAATTGAAGAACGACAAGGTCAGCCGTTTCGACTTTATCCGTCAAATC
GAAGTGGACGGGCAGCTCATTACCTTGGAGAGCGGAGAGTTCCAAGTGTACAAACAAAGCCATTCCGCCTTAACCGCCCTTC
AGACCGAGCAAGAACAAGATCCAGAGCATTCCGGGAAGATGGTTGCGAAACGCCGGTTCAAAATCGGCGACATAGCGGGCGA
ACATACATCTTTTGACAAGCTTCCCAAAGACGTCATGGCGACATATCGCGGGACGGCGTTCGGTTCAGACGATGCCGGCGGA
AAACTGACCTATACTATAGATTTTGCTGCCAAACAGGGACACGGCAAAATCGAACATTTGAAATCGCCCGAACTCAATGTCG
AGCTTGCCACCGCCTATATCAAGCCGGATGAAAAACACCATGCCGTCATCAGCGGTTCCGTCCTTTACAATCAAGACGAGAA
AGGCAGTTACTCCCTCGGTATCTTTGGCGGGCAAGCCCAGGAAGTTGCCGGCAGCGCGGAAGTGGAAACCGCAAACGGCATA
CACCATATCGGTCTTGCCGCCAAGCAATAA

>Secuencia de Ácido Nucleico de la Variante B09 (SEQ ID NO: 8)

TGCAGCAGCGGAGGGGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGTGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCGCTCGACCATAAAG
ACAAAGGTTTGCAGTCTTTAACGCTGGATCAGTCCGTCAGGAAAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA
AACTTATGGAAACGGCGACAGCCTTAATACGGGCAAATTGAAGAACGACAAGGTCAGCCGCTTCGACTTTATCCGTCAAATC
GAAGTGGACGGGAAGCTCATTACCTTGGAGAGCGGAGAGTTCCAAGTGTACAAACAAAGCCATTCCGCCTTAACCGCCCTTC
AGACCGAGCAAGTACAAGACTCGGAGGATTCCGGGAAGATGGTTGCGAAACGCCAGTTCAGAATCGGCGACATAGCGGGCGA
ACATACATCTTTTGACAAGCTTCCCAAAGGCGGCAGTGCGACATATCGCGGGACGGCGTTCGGTTCAGACGATGCTGGCGGA
AAACTGACCTATACTATAGATTTCGCCGCCAAGCAGGGACACGGCAAAATCGAACATTTGAAATCGCCCGAACTCAATGTCG
AGCTTGCCACCGCCTATATCAAGCCGGATGAAAAACGCCATGCCGTTATCAGCGGTTCCGTCCTTTACAACCAAGACGAGAA
AGGCAGTTACTCCCTCGGTATCTTTGGCGGGCAAGCCCAGGAAGTTGCCGGCAGCGCGGAAGTGGAAACCGCAAACGGCATA
CACCATATCGGTCTTGCCGCCAAGCAGTAA

FIG. 1E

>Secuencia de Ácido Nucleico de la Variante B22 (SEQ ID NO: 9)

TGCAGCAGCGGAGGCGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGCGCGGTGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCGCTCGACCATAAAG
ACAAAAGTTTGCAGTCTTTGACGCTGGATCAGTCCGTCAGGAAAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA
AACTTATGGAAACGGCGACAGCCTCAATACGGGCAAATTGAAGAACGACAAGGTCAGCCGCTTCGACTTTATCCGTCAAATC
GAAGTGGACGGGCAGCTCATTACCTTGGAGAGCGGAGAGTTCCAAGTGTACAAACAAAGCCATTCCGCCTTAACCGCCCTTC
AGACCGAGCAAGTACAAGATTCGGAGCATTCAGGGAAGATGGTTGCGAAACGCCAGTTCAGAATCGGCGATATAGCGGGTGA
ACATACATCTTTTGACAAGCTTCCCGAAGGCGGCAGGGCGACATATCGCGGGACGGCATTCGGTTCAGACGATGCCAGTGGA
AAACTGACCTACACCATAGATTTCGCCGCCAAGCAGGGACACGGCAAAATCGAACATTTGAAATCGCCAGAACTCAATGTTG
ACCTGGCCGCCTCCGATATCAAGCCGGATAAAAAACGCCATGCCGTCATCAGCGGTTCCGTCCTTTACAACCAAGCCGAGAA
AGGCAGTTACTCTCTAGGCATCTTTGGCGGGCAAGCCCAGGAAGTTGCCGGCAGCGCAGAAGTGGAAACCGCAAACGGCATA
CGCCATATCGGTCTTGCCGCCAAGCAGTAA

>Secuencia de Ácido Nucleico de la Variante B24 (SEQ ID NO: 10)

TGCAGCAGCGGAGGGGGTGGTGTCGCCGCCGACATCGGTGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCGCTCGACCATAAAG
ACAAAGGTTTGCAGTCTTTGACGCTGGATCAGTCCGTCAGGAAAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA
AACTTATGGAAACGGTGACAGCCTCAATACGGGCAAATTGAAGAACGACAAGGTCAGCCGTTTCGACTTTATCCGCCAAATC
GAAGTGGACGGGCAGCTCATTACCTTGGAGAGTGGAGAGTTCCAAGTATACAAACAAAGCCATTCCGCCTTAACCGCCTTTC
AGACCGAGCAAATACAAGATTCGGAGCATTCCGGGAAGATGGTTGCGAAACGCCAGTTCAGAATCGGCGACATAGCGGGCGA
ACATACATCTTTTGACAAGCTTCCCGAAGGCGGCAGGGCGACATATCGCGGGACGGCGTTCGGTTCAGACGATGCCGGCGGA
AAACTGACCTACACCATAGATTTCGCCGCCAAGCAGGGAAACGGCAAAATCGAACATTTGAAATCGCCAGAACTCAATGTCG
ACCTGGCCGCCGCCGATATCAAGCCGGATGGAAAACGCCATGCCGTCATCAGCGGTTCCGTCCTTTACAACCAAGCCGAGAA
AGGCAGTTACTCCCTCGGTATCTTTGGCGGAAAAGCCCAGGAAGTTGCCGGCAGCGCGGAAGTGAAAACCGTAAACGGCATA
CGCCATATCGGCCTTGCCGCCAAGCAATAA

FIG. 1F

>Secuencia de Ácido Nucleico de la Variante B44 (SEQ ID NO: 11)

TGCAGCAGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGCGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGCGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCAC
CGCTCGACCATAAAGACAAAGGTTTGAAATCCCTGACATTGGAAGACTCCATTTCCCAAAACGGAACACTGACCCTGTCGGC
ACAAGGTGCGGAAAGAACTTTCAAAGCCGGCGACAAAGACAACAGTCTCAACACAGGCAAACTGAAGAACGACAAAATCAGC
CGCTTCGACTTTATCCGTCAAATCGAAGTGGACGGGCAGCTCATTACCTTGGAGAGCGGAGAGTTCCAAGTGTACAAACAAA
GCCATTCCGCCTTAACCGCCCTTCAGACCGAGCAAGTACAAGACTCGGAGCATTCCGGGAAGATGGTTGCGAAACGCCAGTT
CAGAATCGGCGACATAGTGGGCGAACATACATCTTTTGGCAAGCTTCCCAAAGACGTCATGGCGACATATCGCGGGACGGCG
TTCGGTTCAGACGATGCCGGCGGAAAACTGACCTACACCATAGATTTCGCCGCCAAGCAGGGACACGGCAAAATCGAACATT
TGAAATCGCCAGAACTCAATGTTGACCTGGCCGCCGCCGATATCAAGCCGGATGAAAAACACCATGCCGTCATCAGCGGTTC
CGTCCTTTACAACCAAGCCGAGAAAGGCAGTTACTCTCTAGGCATCTTTGGCGGGCAAGCCCAGGAAGTTGCCGGCAGCGCG
GAAGTGGAAACCGCAAACGGCATACGCCATATCGGTCTTGCCGCCAAGCAATAA

FIG. 2A

Secuencias de Aminoácido de la Variante P2086 no lipidada

>Secuencia de Aminoácido de la Variante A04 (SEQ ID NO: 12)
CSSGGGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISRFD
FVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGDKAEYHGKAFSSD
DAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKI
GEKVHEIGIAGKQ

>Secuencia de Aminoácido de la Variante A05 (SEQ ID NO: 13)
CSSGSGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAEKTFKVGDKDNSLNTGKLKNDKISR
FDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFS
SDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATV
KIREKVHEIGIAGKQ

>Secuencia de Aminoácido de la Variante A12 (SEQ ID NO: 14)
CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQI
EVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGR
LHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVH
EIGIAGKQ

>Secuencia de Aminoácido de la Variante A22 (SEQ ID NO: 15)
CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQI
EVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGK
LTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVH
EIGIAGKQ

FIG. 2B

>Secuencia de Aminoácido de la Variante B02 (SEQ ID NO: 16)
CSSGGGGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAERTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKIS
RFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIVGEHTSFDKLPKDVMATYRGTA
FGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSA
EVETANGIRHIGLAAKQ

>Secuencia de Aminoácido de la Variante B03 (SEQ ID NO: 17)
CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQI
EVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQEQDPEHSGKMVAKRRFKIGDIAGEHTSFDKLPKDVMATYRGTAFGSDDAGG
KLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGI
HHIGLAAKQ

>Secuencia de Aminoácido de la Variante B09 (SEQ ID NO: 18)
CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQI
EVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGG
KLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGI
HHIGLAAKQ

>Secuencia de Aminoácido de la Variante B22 (SEQ ID NO: 19)
CSSGGGGVAADIGAVLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQI
EVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDASG
KLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAASDIKPDKKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGI
RHIGLAAKQ

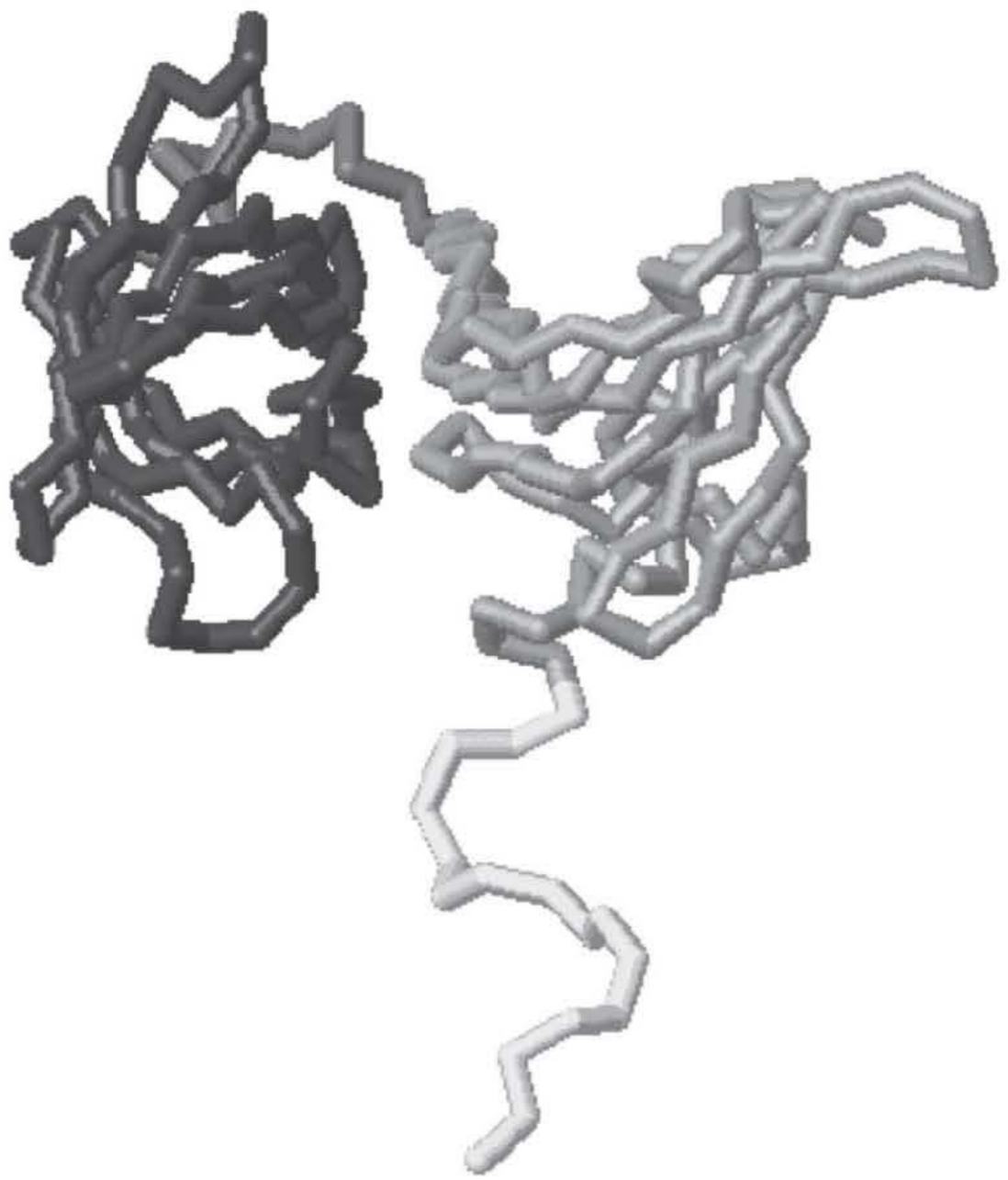
FIG. 2C

>Secuencia de Aminoácido de la Variante B24 (SEQ ID NO: 20)
CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQI
EVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGG
KLTYTIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGI
RHIGLAAKQ

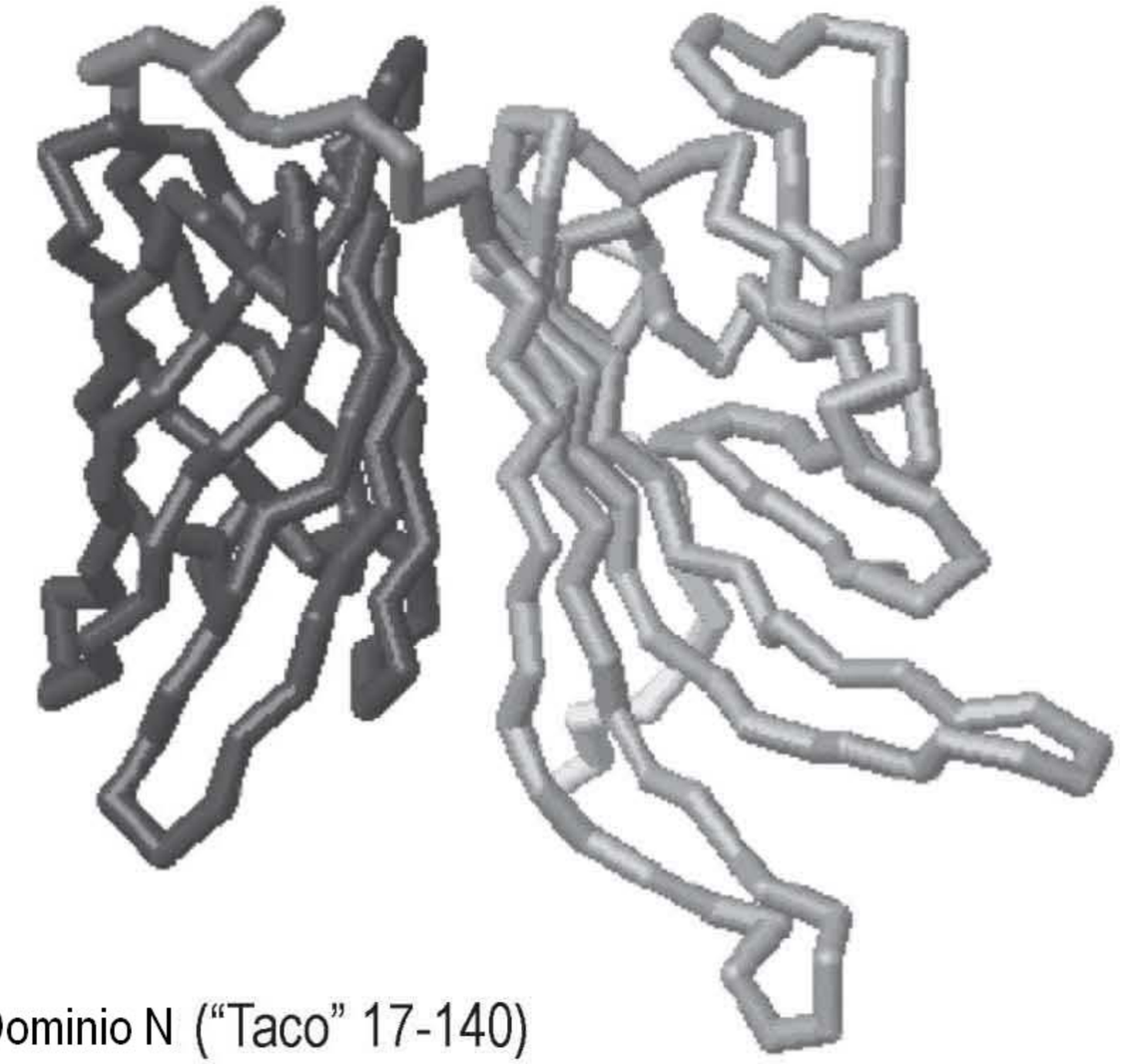
>Secuencia de Aminoácido de la Variante B44 (SEQ ID NO: 21)
CSSGGGGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAERTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKIS
RFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMATYRGTA
FGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSA
EVETANGIRHIGLAAKQ

FIG. 3

Vista Lateral



Vista Superior



Dominio N ("Taco" 17-140)

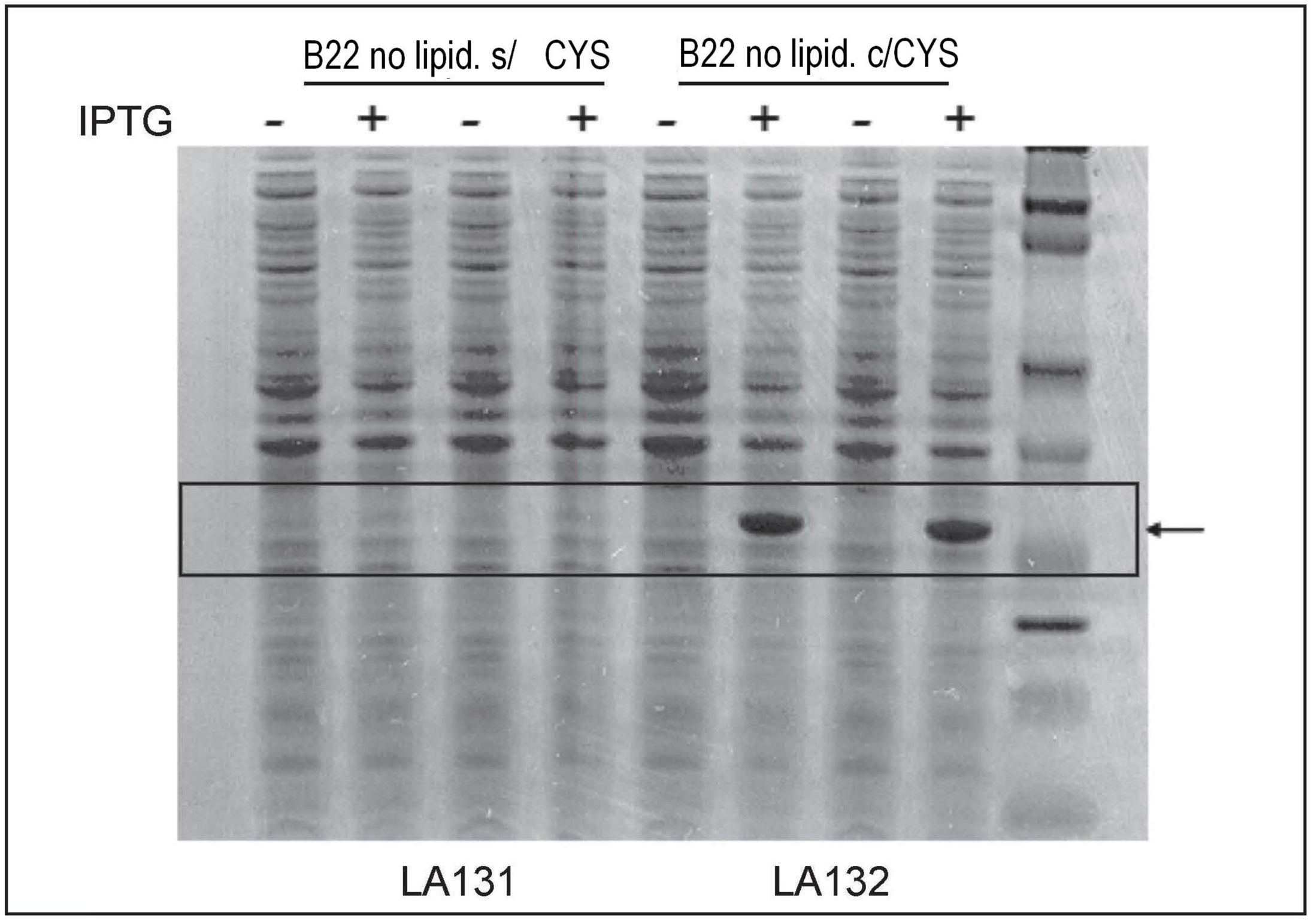
Raíz N-terminal (1-16)

Dominio C ("Cannoli" 155-261)

Vinculador (141-154)

FIG. 4

Eliminación de Resultados Cys N-terminal en Pérdida de Expresión en E. coli



Se obtuvieron resultados similares para el constructo CYS-menos A22.

FIG. 5

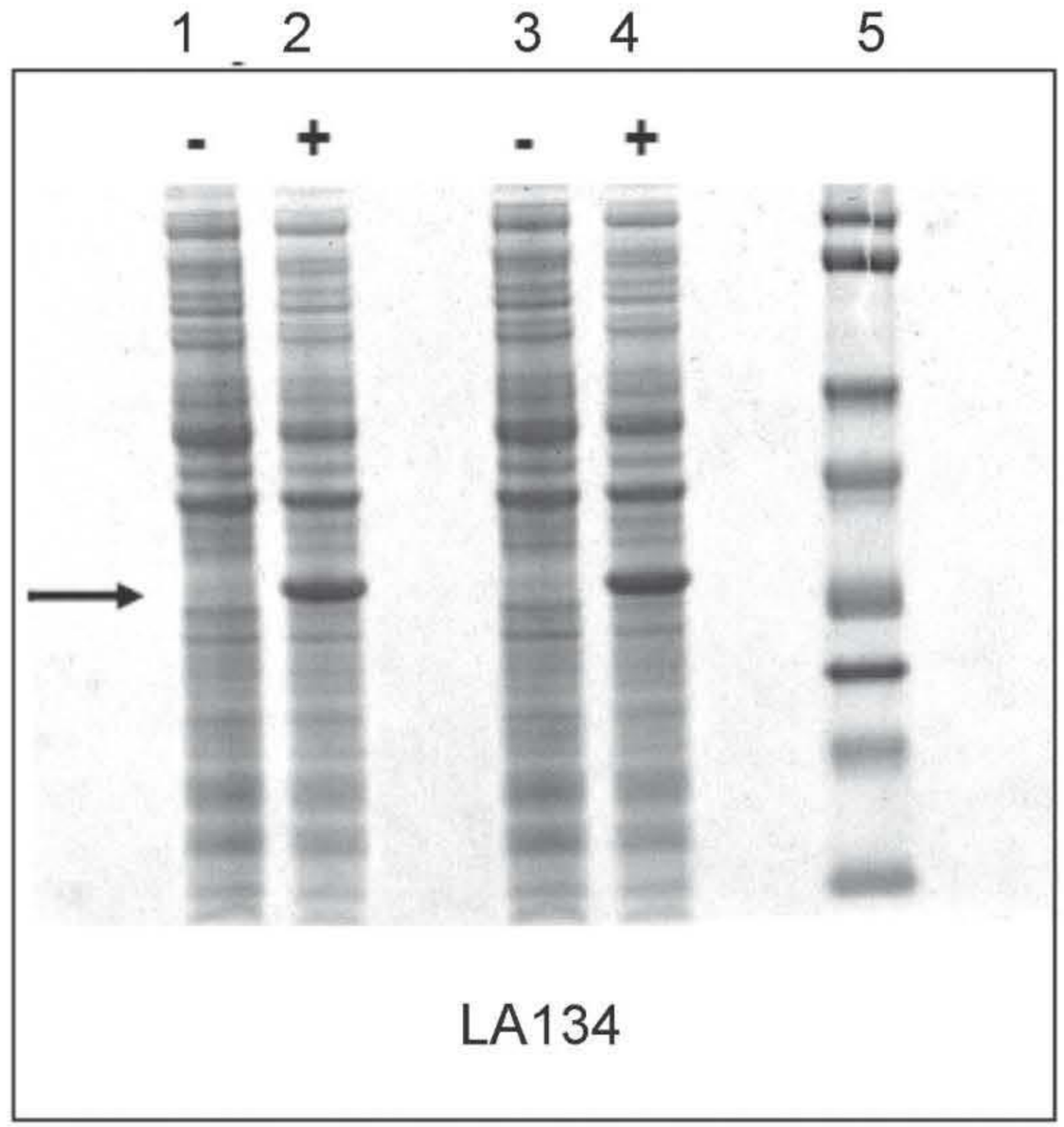
Efecto de la Longitud del Tallo de Gly/Ser sobre la Expresión de ORF2086 No Lipidada

Variante de Proteína	Expresión de Comassie s/ Cys N-term	¿Gly/Ser Extra?
B01 C**SSGGGGSGGGG**VTADIGTGLADALTAP	Si	Si (+5)
B44 C**SSGGGGSGGGG**VAADIGAGLADALTAP	Si	Si (+5)
A05 C**SSGSGSGGGG**VAADIGTGLADALTAP	Si	Si (+4)
A22 C**SSGGGG**VAADIGAGLADALTAP	No*	No
B22 C**SSGGGG**VAADIGAVLADALTAP	No*	No
A19 C**SSGGGG**VAADIGAGLADALTAP	No*	No

*Sí si se agrega una Cys N term trasera

FIG. 6

Niveles Altos de Expresión B09 no lipidada independientemente de un tallo de Gly/Ser corto



	M	S	S	G	**G**	G	G	V	A	A	D	I	**G**	A	G/V
	ATG	AGC	AGC	GGA	GGC	GGC	GGT	GTC	GCC	GCC	GAC	ATC	GGC	GCG	GGG
B22_001	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.T.
B09_004	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	...	...	...	..T	...	...
A22_001	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

FIG. 7

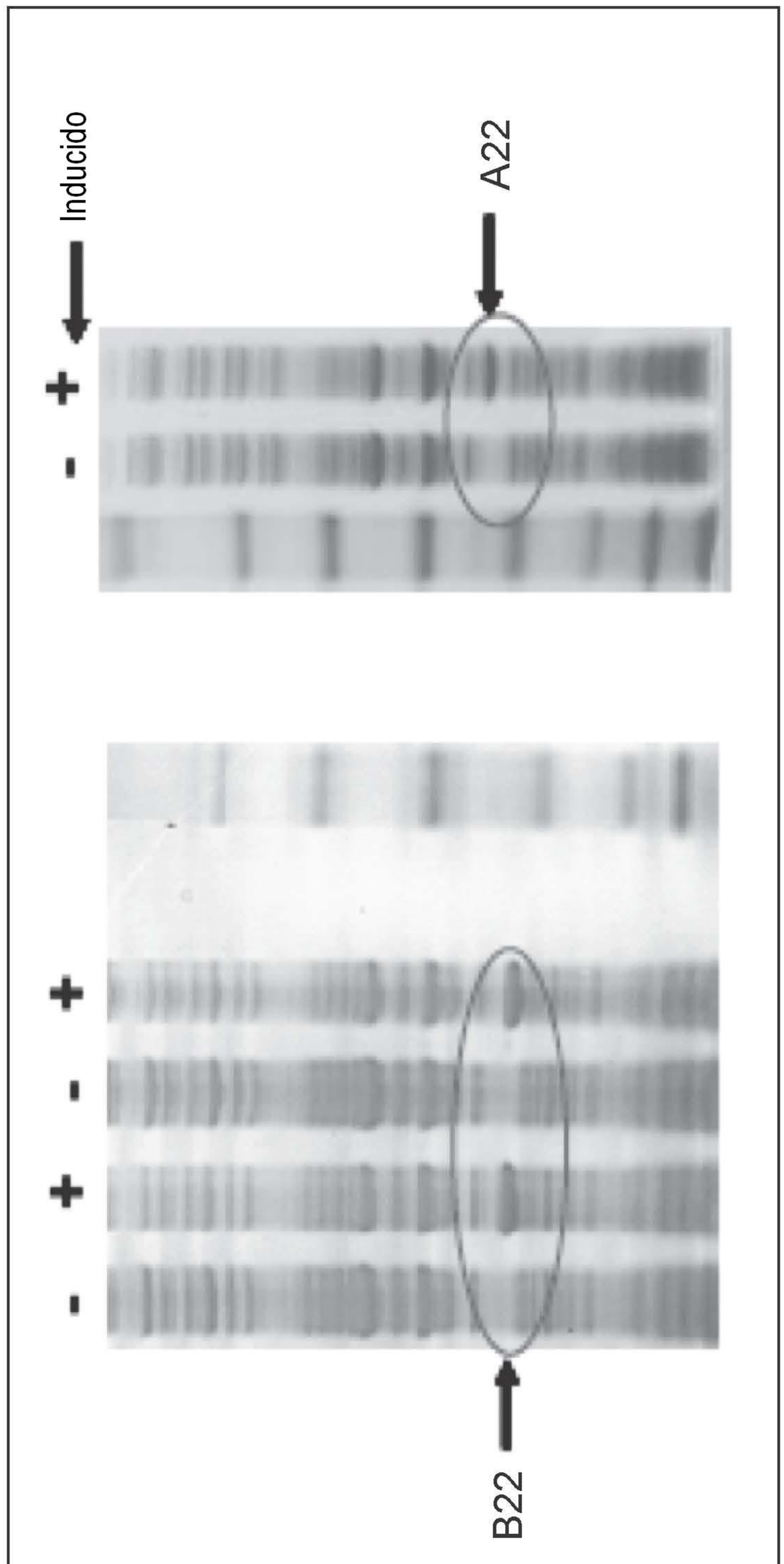

La Optimización por Codones Aumenta la Expresión de las Variantes B22 y A22 no lipidadas
1 2 3 4 5 6 7 8
- + - + - + -
B22
A22
Inducido
Cambios de Codones de Gly B09 N-terminal aplicados a B22 y A22

FIG. 8A

> SEQ ID NO: 43

AGCTCTGGAGGTGGAGGAAGCGGGGGCGGTGGAGTTGCAGCAGACATTGGAGCAGGATTAGCAGATGCACTGACGGCACCGT
TGGATCATAAAGACAAAGGCTTGAAATCGCTTACCTTAGAAGATTCTATTTCACAAAATGGCACCCTTACCTTGTCCGCGCA
AGGCGCTGAACGTACTTTTAAAGCCGGTGACAAAGATAATAGCTTAAATACAGGTAAACTCAAAAATGATAAAATCTCGCGT
TTTGATTTCATTCGTCAAATCGAAGTAGATGGCCAACTTATTACATTAGAAAGCGGTGAATTCCAAGTATATAAACAATCCC
ATTCAGCACTTACAGCATTGCAAACCGAACAGGTCCAAGACTCAGAACATTCCGGCAAAATGGTAGCTAAACGTCAATTCCG
CATCGGTGACATTGTCGGTGAACATACAAGCTTCGGAAAATTACCAAAAGATGTGATGGCGACCTATCGCGGTACGGCATTT
GGATCAGATGATGCAGGCGGTAAATTAACTTATACAATTGACTTTGCAGCAAAACAAGGACATGGCAAAATTGAACATTTAA
AATCTCCCGAACTTAACGTAGATCTCGCAGCAGCAGATATTAAACCAGATGAAAAACACCACGCAGTCATTTCAGGTTCAGT
TTTATACAATCAGGCAGAAAAAGGTTCGTACTCTTTAGGTATTTTTGGCGGGCAAGCTCAAGAAGTTGCAGGTAGCGCAGAA
GTAGAAACGGCAAATGGCATTCGTCACATTGGGTTAGCGGCGAAACAATAA

> SEQ ID NO: 44

SSGGGGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAERTFKAGDKDNSLNTGKLKNDKISR
FDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDVMATYRGTAF
GSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAE
VETANGIRHIGLAAKQ.

FIG. 8B

> SEQ ID NO: 51

AGCAGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGCGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGCGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCGC
TCGACCATAAAGACAAAGGTTTGAAATCCCTGACATTGGAAGACTCCATTTCCCAAAACGGAACACTGACCCTGTCGGCACA
AGGTGCGGAAAGAACTTTCAAAGCCGGCGACAAAGACAACAGTCTCAACACAGGCAAACTGAAGAACGACAAAATCAGCCGC
TTCGACTTTATCCGTCAAATCGAAGTGGACGGGCAGCTCATTACCTTGGAGAGCGGAGAGTTCCAAGTGTACAAACAAAGCC
ATTCCGCCTTAACCGCCCTTCAGACCGAGCAAGTACAAGACTCGGAGCATTCCGGGAAGATGGTTGCGAAACGCCAGTTCAG
AATCGGCGACATAGTGGGCGAACATACATCTTTTGGCAAGCTTCCCAAAGACGTCATGGCGACATATCGCGGGACGGCGTTC
GGTTCAGACGATGCCGGCGGAAAACTGACCTACACCATAGATTTCGCCGCCAAGCAGGGACACGGCAAAATCGAACATTTGA
AATCGCCAGAACTCAATGTTGACCTGGCCGCCGCCGATATCAAGCCGGATGAAAAACACCATGCCGTCATCAGCGGTTCCGT
CCTTTACAACCAAGCCGAGAAAGGCAGTTACTCTCTAGGCATCTTTGGCGGGCAAGCCCAGGAAGTTGCCGGCAGCGCGGAA
GTGGAAACCGCAAACGGCATACGCCATATCGGTCTTGCCGCCAAGCAATAA

> SEQ ID NO: 45

AGCTCTGGAGGTGGAGGAAGCGGGGGCGGTGGAGTTGCAGCAGACATTGGAGCAGGATTAGCAGATGCACTGACGGCACCGT
TGGATCATAAAGACAAAGGCTTGCAGTCGCTTACCTTAGATCAGTCTGTCAGGAAAAATGAGAAACTTAAGTTGGCGGCGCA
AGGCGCTGAAAAAACTTATGGAAACGGTGACAGCTTAAATACAGGTAAACTCAAAAATGATAAAGTCTCGCGTTTTGATTTC
ATTCGTCAAATCGAAGTAGATGGCAAGCTTATTACATTAGAAAGCGGTGAATTCCAAGTATATAAACAATCCCATTCAGCAC
TTACAGCATTGCAAACCGAACAGGTCCAAGACTCAGAAGATTCCGGCAAAATGGTAGCTAAACGTCAATTCCGCATCGGTGA
CATTGCGGGTGAACATACAAGCTTCGACAAATTACCAAAAGGCGGCAGTGCGACCTATCGCGGTACGGCATTTGGATCAGAT
GATGCAGGCGGTAAATTAACTTATACAATTGACTTTGCAGCAAAACAAGGACATGGCAAAATTGAACATTTAAAATCTCCCG
AACTTAACGTAGAGCTCGCAACCGCATATATTAAACCAGATGAAAAACGCCACGCAGTCATTTCAGGTTCAGTTTTATACAA
TCAGGACGAAAAAGGTTCGTACTCTTTAGGTATTTTTGGCGGGCAAGCTCAAGAAGTTGCAGGTAGCGCAGAAGTAGAAACG
GCAAATGGCATTCACCACATTGGGTTAGCGGCGAAACAATAA

FIG. 8C

>SEQ ID NO: 50

SSGGGGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFD
FIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFG
SDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAE
VETANGIHHIGLAAKQ

> SEQ ID NO: 46

AGCTCTGGAGGTGGAGGAGTTGCAGCAGACATTGGAGCAGGATTAGCAGATGCACTGACGGCACCGTTGGATCATAAAGAC
AAAGGCTTGCAGTCGCTTACCTTAGATCAGTCTGTCAGGAAAAATGAGAAACTTAAGTTGGCGGCGCAAGGCGCTGAAAAA
ACTTATGGAAACGGTGACAGCTTAAATACAGGTAAACTCAAAAATGATAAAGTCTCGCGTTTTGATTTCATTCGTCAAATC
GAAGTAGATGGCAAGCTTATTACATTAGAAAGCGGTGAATTCCAAGTATATAAACAATCCCATTCAGCACTTACAGCATTG
CAAACCGAACAGGTCCAAGACTCAGAAGATTCCGGCAAAATGGTAGCTAAACGTCAATTCCGCATCGGTGACATTGCGGGT
GAACATACAAGCTTCGACAAATTACCAAAAGGCGGCAGTGCGACCTATCGCGGTACGGCATTTGGATCAGATGATGCAGGC
GGTAAATTAACTTATACAATTGACTTTGCAGCAAAACAAGGACATGGCAAAATTGAACATTTAAAATCTCCCGAACTTAAC
GTAGAGCTCGCAACCGCATATATTAAACCAGATGAAAAACGCCACGCAGTCATTTCAGGTTCAGTTTTATACAATCAGGAC
GAAAAAGGTTCGTACTCTTTAGGTATTTTTGGCGGGCAAGCTCAAGAAGTTGCAGGTAGCGCAGAAGTAGAAACGGCAAAT
GGCATTCACCACATTGGGTTAGCGGCGAAACAATAA

FIG. 8D

>SEQ ID NO: 47

AGCAGCGGGGGCGGTGGAGTTGCAGCAGACATTGGAGCAGGATTAGCAGATGCACTGACGGCACCGTTGGATCATAAAGACA
AAGGCTTGCAGTCGCTTACCTTAGATCAGTCTGTCAGGAAAAATGAGAAACTTAAGTTGGCGGCGCAAGGCGCTGAAAAAAC
TTATGGAAACGGTGACAGCTTAAATACAGGTAAACTCAAAAATGATAAAGTCTCGCGTTTTGATTTCATTCGTCAAATCGAA
GTAGATGGCAAGCTTATTACATTAGAAAGCGGTGAATTCCAAGTATATAAACAATCCCATTCAGCACTTACAGCATTGCAAA
CCGAACAGGTCCAAGACTCAGAAGATTCCGGCAAAATGGTAGCTAAACGTCAATTCCGCATCGGTGACATTGCGGGTGAACA
TACAAGCTTCGACAAATTACCAAAAGGCGGCAGTGCGACCTATCGCGGTACGGCATTTGGATCAGATGATGCAGGCGGTAAA
TTAACTTATACAATTGACTTTGCAGCAAAACAAGGACATGGCAAAATTGAACATTTAAAATCTCCCGAACTTAACGTAGAGC
TCGCAACCGCATATATTAAACCAGATGAAAAACGCCACGCAGTCATTTCAGGTTCAGTTTTATACAATCAGGACGAAAAAGG
TTCGTACTCTTTAGGTATTTTTGGCGGGCAAGCTCAAGAAGTTGCAGGTAGCGCAGAAGTAGAAACGGCAAATGGCATTCAC
CACATTGGGTTAGCGGCGAAACAATAA

>SEQ ID NO: 48

AGCAGCGGAGGGGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGTGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCGCTCGACCATAAAGACA
AAGGTTTGCAGTCTTTAACACTGGATCAGTCCGTCAGGAAAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAAAAC
TTATGGAAACGGCGACAGCCTTAATACGGGCAAATTGAAGAACGACAAGGTCAGCCGCTTCGACTTTATCCGTCAAATCGAA
GTGGACGGGAAGCTCATTACCTTGGAGAGCGGAGAGTTCCAAGTGTACAAACAAAGCCATTCCGCCTTAACCGCCCTTCAGA
CCGAGCAAGTACAAGACTCGGAGGATTCCGGGAAGATGGTTGCGAAACGCCAGTTCAGAATCGGCGACATAGCGGGCGAACA
TACATCTTTTGACAAGCTTCCCAAAGGCGGCAGTGCGACATATCGCGGGACGGCGTTCGGTTCAGACGATGCTGGCGGAAAA
CTGACCTATACTATAGATTTCGCCGCCAAGCAGGGACACGGCAAAATCGAACATTTGAAATCGCCCGAACTCAATGTCGAGC
TTGCCACCGCCTATATCAAGCCGGATGAAAAACGCCATGCCGTTATCAGCGGTTCCGTCCTTTACAACCAAGACGAGAAAGG
CAGTTACTCCCTCGGTATCTTTGGCGGGCAAGCCCAGGAAGTTGCCGGCAGCGCGGAAGTGGAAACCGCAAACGGCATACAC
CATATCGGTCTTGCCGCCAAGCAGTAA

FIG. 8E

>SEQ ID NO: 49

SSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIE
VDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSD
DAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVET
ANGIHHIGLAAKQ

>SEQ ID NO: 54

AGCAGCGGAAGCGGAAGCGGAGGCGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGCACAGGGCTTGCCGATGCACTAACTGCGCCGCTCG
ACCATAAAGACAAAGGTTTGAAATCCCTGACATTGGAAGACTCCATTTCCCAAAACGGAACACTGACCCTGTCGGCACAAGG
TGCGGAAAAAACTTTCAAAGTCGGCGACAAAGACAACAGTCTCAATACAGGCAAATTGAAGAACGACAAAATCAGCCGCTTC
GACTTTGTGCAAAAAATCGAAGTGGACGGACAAACCATCACGCTGGCAAGCGGCGAATTTCAAATATACAAACAGGACCACT
CCGCCGTCGTTGCCCTACAGATTGAAAAAATCAACAACCCCGACAAAATCGACAGCCTGATAAACCAACGCTCCTTCCTTGT
CAGCGGTTTGGGCGGAGAACATACCGCCTTCAACCAACTGCCCAGCGGCAAAGCCGAGTATCACGGCAAAGCATTCAGCTCC
GACGATGCCGGCGGAAAACTGACCTATACCATAGATTTTGCCGCCAAACAGGGACACGGCAAAATCGAACACCTGAAAACAC
CCGAGCAGAATGTCGAGCTTGCCTCCGCCGAACTCAAAGCAGATGAAAAATCACACGCCGTCATTTTGGGCGACACGCGCTA
CGGCAGCGAAGAAAAAGGCACTTACCACCTCGCTCTTTTCGGCGACCGAGCCCAAGAAATCGCCGGCTCGGCAACCGTGAAG
ATAAGGGAAAAGGTTCACGAAATCGGCATCGCCGGCAAACAGTAG

>SEQ ID NO: 55

SSGSGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAEKTFKVGDKDNSLNTGKLKNDKISRF
DFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSS
DDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVK
IREKVHEIGIAGKQ.

FIG. 8F

> SEQ ID NO: 57

SSGGGGSGGGGVTADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDF
IRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQEQDPEHSEKMVAKRRFRIGDIAGEHTSFDKLPKDVMATYRGTAFGSD
DAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAVAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGEKAQEVAGSAEVET
ANGIHHIGLAAKQ

> GenBank AY330406 (SEQ ID NO: 58)

CSSGGGGSGGGGVTADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFD
FIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQEQDPEHSEKMVAKRRFRIGDIAGEHTSFDKLPKDVMATYRGTAFGS
DDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAVAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGEKAQEVAGSAEVE
TANGIHHIGLAAKQ

>GenBank FJ184191 (SEQ ID NO: 59)

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLILDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQI
EVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFSSDDAGG
KLIYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGI
RHIGLAAKQ

> GenBank AY330385 (SEQ ID NO: 60)

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQI
EVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDASG
KLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAASDIKPDKKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGI
RHIGLAAKQ

FIG. 8G

> SEQ ID NO: 61

GGCAGCAGCGGAGGCGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGCGCGGTGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCGCTCGACCATAAAG
ACAAAAGTTTGCAGTCTTTGACGCTGGATCAGTCCGTCAGGAAAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA
AACTTATGGAAACGGCGACAGCCTCAATACGGGCAAATTGAAGAACGACAAGGTCAGCCGCTTCGACTTTATCCGTCAAATC
GAAGTGGACGGGCAGCTCATTACCTTGGAGAGCGGAGAGTTCCAAGTGTACAAACAAAGCCATTCCGCCTTAACCGCCCTTC
AGACCGAGCAAGTACAAGATTCGGAGCATTCAGGGAAGATGGTTGCGAAACGCCAGTTCAGAATCGGCGATATAGCGGGTGA
ACATACATCTTTTGACAAGCTTCCCGAAGGCGGCAGGGCGACATATCGCGGGACGGCATTCGGTTCAGACGATGCCAGTGGA
AAACTGACCTACACCATAGATTTCGCCGCCAAGCAGGGACACGGCAAAATCGAACATTTGAAATCGCCAGAACTCAATGTTG
ACCTGGCCGCCTCCGATATCAAGCCGGATAAAAAACGCCATGCCGTCATCAGCGGTTCCGTCCTTTACAACCAAGCCGAGAA
AGGCAGTTACTCTCTAGGCATCTTTGGCGGGCAAGCCCAGGAAGTTGCCGGCAGCGCAGAAGTGGAAACCGCAAACGGCATA
CGCCATATCGGTCTTGCCGCCAAGCAGTAA

> SEQ ID NO: 62

GSSGGGGVAADIGAVLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQI
EVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDASG
KLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAASDIKPDKKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGI
RHIGLAAKQ

FIG. 8H

> SEQ ID NO: 63

GGCAGCAGCGGAGGCGGCGGTGTCGCCGCCGACATCGGCGCGGGGCTTGCCGATGCACTAACCGCACCGCTCGACCATAAAG
ACAAAAGTTTGCAGTCTTTGACGCTGGATCAGTCCGTCAGGAAAAACGAGAAACTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAA
AACTTATGGAAACGGCGACAGCCTCAATACGGGCAAATTGAAGAACGACAAGGTCAGCCGCTTCGACTTTATCCGTCAAATC
GAAGTGGACGGGCAGCTCATTACCTTGGAGAGCGGAGAGTTCCAAATATACAAACAGGACCACTCCGCCGTCGTTGCCCTAC
AGATTGAAAAAATCAACAACCCCGACAAAATCGACAGCCTGATAAACCAACGCTCCTTCCTTGTCAGCGGTTTGGGTGGAGA
ACATACCGCCTTCAACCAACTGCCCAGCGGCAAAGCCGAGTATCACGGCAAAGCATTCAGCTCCGACGATGCTGGCGGAAAA
CTGACCTATACCATAGATTTCGCCGCCAAACAGGGACACGGCAAAATCGAACACTTGAAAACACCCGAGCAAAATGTCGAGC
TTGCCTCCGCCGAACTCAAAGCAGATGAAAAATCACACGCCGTCATTTTGGGCGACACGCGCTACGGCGGCGAAGAAAAAGG
CACTTACCACCTCGCCCTTTTCGGCGACCGCGCCCAAGAAATCGCCGGCTCGGCAACCGTGAAGATAAGGGAAAAGGTTCAC
GAAATCGGCATCGCCGGCAAACAGTAA

> SEQ ID NO: 64

GSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQI
EVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGK
LTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVH
EIGIAGKQ

FIG. 9A

```
                1                                                          60
A05       (1)   CSSGSGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAEKT
A12       (1)   CSSG----GGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKT
A22       (1)   CSSG----GGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKT
A62       (1)   CSSG----GGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKT
B09       (1)   CSSG----GGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKT
B24       (1)   CSSG----GGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKT
Consenso  (1)   CSSG    GGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKT

                61                                                        120
A05       (61)  EKVGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDEVQKIEVDGQIITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEK
A12       (57)  YGNGD---SLNTGKLKNDKVSRFDEIRQIEVDGQIITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEK
A22       (57)  YGNGD---SLNTGKLKNDKVSRFDEIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEK
A62       (57)  YGNGD---SLNTGKLKNDKVSRFDEIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQ
B09       (57)  YGNGD---SLNTGKLKNDKVSRFDEIRQIEVDGKLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQ
B24       (57)  YGNGD---SLNTGKLKNDKVSRFDEIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQ
Consenso  (61)  YGNGD   SLNTGKLKNDKVSRFDEIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQSHSALVALQTEQ
```

FIG. 9B

```
                121                                                        180
A05      (121)  INNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSG-KAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFA
A12      (114)  INNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPDG-KAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFT
A22      (114)  INNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPSG-KAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFA
A62      (114)  VQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFA
B09      (114)  VQDSEDSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGSATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFA
B24      (114)  IQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFA
Consenso (121)  INNSDKSGSLINQRSFRISGIAGEHTAFNQLP GGKATYRGTAFSSDDAGGKLTYTIDFA

                181                                                        240
A05      (180)  AKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQE
A12      (173)  KKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQE
A22      (173)  AKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQE
A62      (174)  AKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQE
B09      (174)  AKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKRHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQE
B24      (174)  AKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQE
Consenso (181)  AKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQE

                241                  262
A05      (240)  IAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ     (SEQ ID NO: 13)
A12      (233)  IAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ     (SEQ ID NO: 14)
A22      (233)  IAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ     (SEQ ID NO: 15)
A62      (234)  IAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ     (SEQ ID NO: 70)
B09      (234)  VAGSAEVETANGIHHIGIAAKQ     (SEQ ID NO: 18)
B24      (234)  VAGSAEVKTVNGIRHIGIAAKQ     (SEQ ID NO: 20)
Consenso;(241)  IAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ     (SEQ ID NO: 78)
```

Spanish-SequenceListing
LISTADO DE SECUENCIAS

<110> PFIZER INC.
Anderson, Annaliesa S.
Hoiseth, Susan K.
Jansen, Kathrin U.
Mark, Ruppen E.
Justin, Moran K.

<120> COMPOSICIONES DE NEISSERIA MENINGITIDIS Y MÉTODOS DE LAS MISMAS

<130> PC071917

<160> 81

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 780
<212> ADN
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 1
tgcagcagcg gaggcggagg cggcggtgtc gccgccgaca tcggcacggg gcttgccgat 60

gcactaactg cgccgctcga ccataaagac aaaggtttga atccctgac attggaagac 120

tccattcccc aaaacggaac actgaccctg tcggcacaag gtgcggaaaa aactttcaaa 180

gccggcgaca aagacaacag cctcaacacg ggcaaactga agaacgacaa aatcagccgc 240

ttcgacttcg tgcaaaaaat cgaagtggac ggacaaacca tcacactggc aagcggcgaa 300

tttcaaatat acaaacagga ccactccgcc gtcgttgccc tacagattga aaaaatcaac 360

aaccccgaca aaatcgacag cctgataaac caacgctcct tccttgtcag cggtttgggc 420

ggagaacata ccgccttcaa ccaactgccc ggcgacaaag ccgagtatca cggcaaagca 480

ttcagctccg acgatgccgg cggaaaactg acctatacca tagattttgc cgccaaacag 540

ggacacggca aaatcgaaca cctgaaaaca cccgagcaaa atgtcgagct tgccgccgcc 600

gaactcaaag cagatgaaaa atcacacgcc gtcattttgg gcgacacgcg ctacggcagc 660

gaagaaaaag gcacttacca cctcgccctt ttcggcgacc gcgcccaaga aatcgccggc 720

tcggcaaccg tgaagatagg ggaaaaggtt cacgaaatcg gcatcgccgg caaacagtag 780

<210> 2
<211> 786
<212> ADN
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 2
tgcagcagcg gaagcggaag cggaggcggc ggtgtcgccg ccgacatcgg cacagggctt 60

gccgatgcac taactgcgcc gctcgaccat aaagacaaag gtttgaaatc cctgacattg 120

gaagactcca tttcccaaaa cggaacactg accctgtcgg cacaaggtgc ggaaaaaact 180

ttcaaagtcg gcgacaaaga caacagtctc aatacaggca aattgaagaa cgacaaaatc 240

agccgcttcg actttgtgca aaaaatcgaa gtggacggac aaaccatcac gctggcaagc 300

ggcgaatttc aaatatacaa acaggaccac tccgccgtcg ttgccctaca gattgaaaaa 360

atcaacaacc ccgacaaaat cgacagcctg ataaaccaac gctccttcct tgtcagcggt 420

ttgggcggag aacataccgc cttcaaccaa ctgcccagcg gcaaagccga gtatcacggc 480

aaagcattca gctccgacga tgccggcgga aaactgacct ataccataga ttttgccgcc 540

aaacagggac acggcaaaat cgaacacctg aaaacacccg agcagaatgt cgagcttgcc 600

tccgccgaac tcaaagcaga tgaaaaatca cacgccgtca ttttgggcga cacgcgctac 660

ggcagcgaag aaaaaggcac ttaccacctc gctcttttcg gcgaccgagc ccaagaaatc 720

gccggctcgg caaccgtgaa gataagggaa aaggttcacg aaatcggcat cgccggcaaa 780

cagtag 786

<210> 3
<211> 765
<212> ADN
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 3
tgcagcagcg gaggcggcgg tgtcgccgcc gacatcggcg cggggcttgc cgatgcacta 60

accgcaccgc tcgaccataa agacaaaagt ttgcagtctt tgacgctgga tcagtccgtc 120

aggaaaaacg agaaactgaa gctggcggca caaggtgcgg aaaaaactta tggaaacggc 180

gacagcctca atacgggcaa attgaagaac gacaaggtca gccgcttcga ctttatccgt 240

caaatcgaag tggacggaca aaccatcacg ctggcaagcg gcgaatttca aatatacaaa 300

cagaaccact ccgccgtcgt tgccctacag attgaaaaaa tcaacaaccc cgacaaaatc 360

gacagcctga taaaccaacg ctccttcctt gtcagcggtt tgggcggaga acataccgcc 420

ttcaaccaac tgcctgacgg caaagccgag tatcacggca aagcattcag ctccgacgac 480

ccgaacggca ggctgcacta ctccattgat tttaccaaaa aacagggtta cggcagaatc 540

gaacacctga aaacgcccga gcagaatgtc gagcttgcct ccgccgaact caaagcagat 600

gaaaaatcac acgccgtcat tttgggcgac acgcgctacg gcggcgaaga aaaaggcact 660

taccacctcg ccctttttcgg cgaccgcgcc caagaaatcg ccggctcggc aaccgtgaag 720

ataagggaaa aggttcacga aatcggcatc gccggcaaac agtag 765

<210> 4
<211> 765
<212> ADN
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 4
tgcagcagcg gaggggggcgg tgtcgccgcc gacattggtg cggggcttgc cgatgcacta 60

accgcaccgc tcgaccataa agacaaaagt ttgcagtctt tgacgctgga tcagtccgtc 120

aggaaaaacg agaaactgaa gctggcggca caaggtgcgg aaaaaactta tggaaacggc 180

gacagcctca atacgggcaa attgaagaac gacaaggtca gccgcttcga ctttatccgt 240

caaatcgaag tggacggaca aaccatcacg ctggcaagcg gcgaatttca aatatacaaa 300

cagaaccact ccgccgtcgt tgccctacag attgaaaaaa tcaacaaccc cgacaaaatc 360

gacagcctga taaaccaacg ctccttcctt gtcagcggtt tgggcggaga acataccgcc 420

ttcaaccaac tgcctgacgg caaagccgag tatcacggca aagcattcag ctccgacgac 480

ccgaacggca ggctgcacta ctccattgat tttaccaaaa aacagggtta cggcagaatc 540

gaacacctga aaacgcccga gcagaatgtc gagcttgcct ccgccgaact caaagcagat 600

gaaaaatcac acgccgtcat tttgggcgac acgcgctacg gcggcgaaga aaaaggcact 660

taccacctcg ccctttttcgg cgaccgcgcc caagaaatcg ccggctcggc aaccgtgaag 720

ataagggaaa aggttcacga aatcggcatc gccggcaaac agtag 765

<210> 5
<211> 765
<212> ADN
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 5
tgcagcagcg gaggcggcgg tgtcgccgcc gacatcggcg cggggcttgc cgatgcacta 60

accgcaccgc tcgaccataa agacaaaagt ttgcagtctt tgacgctgga tcagtccgtc 120

aggaaaaacg agaaactgaa gctggcggca caaggtgcgg aaaaaactta tggaaacggc 180

gacagcctca atacgggcaa attgaagaac gacaaggtca gccgcttcga ctttatccgt 240

caaatcgaag tggacgggca gctcattacc ttggagagcg gagagttcca aatatacaaa 300

caggaccact ccgccgtcgt tgccctacag attgaaaaaa tcaacaaccc cgacaaaatc 360

gacagcctga taaaccaacg ctccttcctt gtcagcggtt tgggtggaga acataccgcc 420

ttcaaccaac tgcccagcgg caaagccgag tatcacggca aagcattcag ctccgacgat 480

gctggcggaa aactgaccta taccatagat ttcgccgcca aacagggaca cggcaaaatc 540

gaacacttga aaacacccga gcaaaatgtc gagcttgcct ccgccgaact caaagcagat 600

gaaaaatcac acgccgtcat tttgggcgac acgcgctacg gcggcgaaga aaaaggcact 660

taccacctcg ccctttttcgg cgaccgcgcc caagaaatcg ccggctcggc aaccgtgaag 720

ataagggaaa aggttcacga aatcggcatc gccggcaaac agtag 765

<210> 6
<211> 792
<212> ADN
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 6
tgcagcagcg gaggcggcgg aagcggaggc ggcggtgtcg ccgccgacat cggcgcgggg 60

cttgccgatg cactaaccgc accgctcgac cataaagaca aaggtttgaa atccctgaca 120

ttggaagact ccatttccca aaacggaaca ctgaccctgt cggcacaagg tgcggaaaga 180

actttcaaag ccggcgacaa agacaacagt ctcaacacag gcaaactgaa gaacgacaaa 240

atcagccgct tcgactttat ccgtcaaatc gaagtggacg ggcagctcat taccttggag 300

agcggagagt tccaagtgta caaacaaagc cattccgcct taaccgccct tcagaccgag 360

caagtacaag actcggagca ttccgggaag atggttgcga aacgccagtt cagaatcggc 420

gacatagtgg gcgaacatac atcttttgac aagcttccca aagacgtcat ggcgacatat 480

cgcgggacgg cgttcggttc agacgatgcc ggcggaaaac tgacctacac catagatttc 540

gccgccaagc agggacacgg caaaatcgaa catttgaaat cgcctgaact caatgttgac 600

ctggccgccg ccgatatcaa gccggatgaa aaacaccatg ccgtcatcag cggttccgtc 660

ctttacaacc aagccgagaa aggcagttac tctctaggca tctttggcgg gcaagcccag 720

gaagttgccg gcagcgcgga agtggaaacc gcaaacggca tacgccatat cggtcttgcc 780

gccaagcaat aa 792

<210> 7
<211> 768
<212> ADN
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 7
tgcagcagcg gaggcggcgg tgtcgccgcc gacatcggcg cggggcttgc cgatgcacta 60

accgcaccgc tcgaccataa agacaaaagt ttgcagtctt tgacgctgga tcagtccgtc 120

aggaaaaacg agaaactgaa gctggcggca caaggtgcgg aaaaaactta tggaaacggc 180

gacagcctta atacgggcaa attgaagaac gacaaggtca gccgtttcga ctttatccgt 240

caaatcgaag tggacgggca gctcattacc ttggagagcg gagagttcca agtgtacaaa 300

caaagccatt ccgccttaac cgcccttcag accgagcaag aacaagatcc agagcattcc 360

gggaagatgg ttgcgaaacg ccggttcaaa atcggcgaca tagcgggcga acatacatct 420

tttgacaagc ttcccaaaga cgtcatggcg acatatcgcg ggacggcgtt cggttcagac 480

gatgccggcg gaaaactgac ctatactata gattttgctg ccaaacaggg acacggcaaa 540

atcgaacatt tgaaatcgcc cgaactcaat gtcgagcttg ccaccgccta tatcaagccg 600

gatgaaaaac accatgccgt catcagcggt tccgtccttt acaatcaaga cgagaaaggc 660

agttactccc tcggtatctt tggcgggcaa gcccaggaag ttgccggcag cgcggaagtg 720

gaaaccgcaa acggcataca ccatatcggt cttgccgcca agcaataa 768

<210> 8
<211> 768
<212> ADN
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 8
tgcagcagcg gagggggcgg tgtcgccgcc gacatcggtg cggggcttgc cgatgcacta 60

accgcaccgc tcgaccataa agacaaaggt ttgcagtctt taacgctgga tcagtccgtc 120

aggaaaaacg agaaactgaa gctggcggca caaggtgcgg aaaaaactta tggaaacggc 180

gacagcctta atacgggcaa attgaagaac gacaaggtca gccgcttcga ctttatccgt 240

caaatcgaag tggacgggaa gctcattacc ttggagagcg gagagttcca agtgtacaaa 300

caaagccatt ccgccttaac cgcccttcag accgagcaag tacaagactc ggaggattcc 360

gggaagatgg ttgcgaaacg ccagttcaga atcggcgaca tagcgggcga acatacatct 420

tttgacaagc ttcccaaagg cggcagtgcg acatatcgcg ggacggcgtt cggttcagac 480

gatgctggcg gaaaactgac ctatactata gatttcgccg ccaagcaggg acacggcaaa 540

atcgaacatt tgaaatcgcc cgaactcaat gtcgagcttg ccaccgccta tatcaagccg 600

gatgaaaaac gccatgccgt tatcagcggt tccgtccttt acaaccaaga cgagaaaggc 660

agttactccc tcggtatctt tggcgggcaa gcccaggaag ttgccggcag cgcggaagtg 720

gaaaccgcaa acggcataca ccatatcggt cttgccgcca agcagtaa 768

<210> 9
<211> 768
<212> ADN
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 9
tgcagcagcg gaggcggcgg tgtcgccgcc gacatcggcg cggtgcttgc cgatgcacta 60

accgcaccgc tcgaccataa agacaaaagt ttgcagtctt tgacgctgga tcagtccgtc 120

aggaaaaacg agaaactgaa gctggcggca caaggtgcgg aaaaaactta tggaaacggc 180

gacagcctca atacgggcaa attgaagaac gacaaggtca gccgcttcga ctttatccgt 240

caaatcgaag tggacgggca gctcattacc ttggagagcg gagagttcca agtgtacaaa 300

caaagccatt ccgccttaac cgcccttcag accgagcaag tacaagattc ggagcattca 360

gggaagatgg ttgcgaaacg ccagttcaga atcggcgata tagcgggtga acatacatct 420

tttgacaagc ttcccgaagg cggcagggcg acatatcgcg ggacggcatt cggttcagac 480

gatgccagtg gaaaactgac ctacaccata gatttcgccg ccaagcaggg acacggcaaa 540

atcgaacatt tgaaatcgcc agaactcaat gttgacctgg ccgcctccga tatcaagccg 600

gataaaaaac gccatgccgt catcagcggt tccgtccttt acaaccaagc cgagaaaggc 660

agttactctc taggcatctt tggcgggcaa gcccaggaag ttgccggcag cgcagaagtg 720

gaaaccgcaa acggcatacg ccatatcggt cttgccgcca agcagtaa 768

<210> 10
<211> 768
<212> ADN
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 10
tgcagcagcg gaggggtgg tgtcgccgcc gacatcggtg cggggcttgc cgatgcacta 60

accgcaccgc tcgaccataa agacaaaggt ttgcagtctt tgacgctgga tcagtccgtc 120

aggaaaaacg agaaactgaa gctggcggca caaggtgcgg aaaaaactta tggaaacggt 180

gacagcctca atacgggcaa attgaagaac gacaaggtca gccgtttcga ctttatccgc 240

caaatcgaag tggacgggca gctcattacc ttggagagtg gagagttcca agtatacaaa 300

caaagccatt ccgccttaac cgcctttcag accgagcaaa tacaagattc ggagcattcc 360

gggaagatgg ttgcgaaacg ccagttcaga atcggcgaca tagcgggcga acatacatct 420

tttgacaagc ttcccgaagg cggcagggcg acatatcgcg ggacggcgtt cggttcagac 480

gatgccggcg gaaaactgac ctacaccata gatttcgccg ccaagcaggg aaacggcaaa 540

atcgaacatt tgaaatcgcc agaactcaat gtcgacctgg ccgccgccga tatcaagccg 600

gatggaaaac gccatgccgt catcagcggt tccgtccttt acaaccaagc cgagaaaggc 660

agttactccc tcggtatctt tggcggaaaa gcccaggaag ttgccggcag cgcggaagtg 720

aaaaccgtaa acggcatacg ccatatcggc cttgccgcca agcaataa 768

<210> 11
<211> 792
<212> ADN
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 11
tgcagcagcg gaggcggcgg aagcggaggc ggcggtgtcg ccgccgacat cggcgcgggg 60

cttgccgatg cactaaccgc accgctcgac cataaagaca aaggtttgaa atccctgaca 120

ttggaagact ccatttccca aaacggaaca ctgaccctgt cggcacaagg tgcggaaaga 180

actttcaaag ccggcgacaa agacaacagt ctcaacacag gcaaactgaa gaacgacaaa 240

atcagccgct tcgactttat ccgtcaaatc gaagtggacg ggcagctcat taccttggag 300

agcggagagt tccaagtgta caaacaaagc cattccgcct taaccgccct tcagaccgag 360

caagtacaag actcggagca ttccgggaag atggttgcga aacgccagtt cagaatcggc 420

gacatagtgg gcgaacatac atcttttggc aagcttccca aagacgtcat ggcgacatat 480

cgcgggacgg cgttcggttc agacgatgcc ggcggaaaac tgacctacac catagatttc 540

gccgccaagc agggacacgg caaaatcgaa catttgaaat cgccagaact caatgttgac 600

ctggccgccg ccgatatcaa gccggatgaa aaacaccatg ccgtcatcag cggttccgtc 660

ctttacaacc aagccgagaa aggcagttac tctctaggca tctttggcgg gcaagcccag 720

gaagttgccg gcagcgcgga agtggaaacc gcaaacggca tacgccatat cggtcttgcc 780

gccaagcaat aa 792

<210> 12
<211> 259
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 12

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Thr
1 5 10 15

Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly
20 25 30

Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Pro Gln Asn Gly Thr Leu
35 40 45

Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Phe Lys Ala Gly Asp Lys
50 55 60

Asp Asn Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Ile Ser Arg
65 70 75 80

Phe Asp Phe Val Gln Lys Ile Glu Val Asp Gly Gln Thr Ile Thr Leu
85 90 95

Ala Ser Gly Glu Phe Gln Ile Tyr Lys Gln Asp His Ser Ala Val Val
100 105 110

Ala Leu Gln Ile Glu Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile Asp Ser Leu
115 120 125

Ile Asn Gln Arg Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly Glu His Thr
130 135 140

Ala Phe Asn Gln Leu Pro Gly Asp Lys Ala Glu Tyr His Gly Lys Ala
145 150 155 160

Phe Ser Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe
165 170 175

Ala Ala Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu
180 185 190

```
Gln Asn Val Glu Leu Ala Ala Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser
        195                 200                 205

His Ala Val Ile Leu Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Ser Glu Glu Lys Gly
    210                 215                 220

Thr Tyr His Leu Ala Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly
225                 230                 235                 240

Ser Ala Thr Val Lys Ile Gly Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala
                245                 250                 255

Gly Lys Gln
```

<210> 13
<211> 261
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 13

```
Cys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile
1               5                   10                  15

Gly Thr Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp
            20                  25                  30

Lys Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Ser Gln Asn Gly
        35                  40                  45

Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Phe Lys Val Gly
    50                  55                  60

Asp Lys Asp Asn Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Ile
65                  70                  75                  80

Ser Arg Phe Asp Phe Val Gln Lys Ile Glu Val Asp Gly Gln Thr Ile
                85                  90                  95

Thr Leu Ala Ser Gly Glu Phe Gln Ile Tyr Lys Gln Asp His Ser Ala
            100                 105                 110

Val Val Ala Leu Gln Ile Glu Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile Asp
        115                 120                 125

Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly Glu
    130                 135                 140
```

```
His Thr Ala Phe Asn Gln Leu Pro Ser Gly Lys Ala Glu Tyr His Gly
145                 150                 155                 160

Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile
                165                 170                 175

Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Thr
            180                 185                 190

Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu
        195                 200                 205

Lys Ser His Ala Val Ile Leu Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Ser Glu Glu
    210                 215                 220

Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile
225                 230                 235                 240

Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys Ile Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly
                245                 250                 255

Ile Ala Gly Lys Gln
            260
```

<210> 14
<211> 254
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 14

```
Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu
1               5                   10                  15

Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln
            20                  25                  30

Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu
        35                  40                  45

Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn
    50                  55                  60

Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg
65                  70                  75                  80

Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Thr Ile Thr Leu Ala Ser Gly Glu Phe
                85                  90                  95
```

```
Gln Ile Tyr Lys Gln Asn His Ser Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu
            100                 105                 110

Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser
        115                 120                 125

Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu
    130                 135                 140

Pro Asp Gly Lys Ala Glu Tyr His Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp
145                 150                 155                 160

Pro Asn Gly Arg Leu His Tyr Ser Ile Asp Phe Thr Lys Lys Gln Gly
                165                 170                 175

Tyr Gly Arg Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu
            180                 185                 190

Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu
        195                 200                 205

Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Gly Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala
    210                 215                 220

Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys
225                 230                 235                 240

Ile Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln
                245                 250
```

<210> 15
<211> 254
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 15

```
Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu
1               5                   10                  15

Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln
            20                  25                  30

Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu
        35                  40                  45

Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn
    50                  55                  60
```

```
Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg
65                  70                  75                  80

Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe
                85                  90                  95

Gln Ile Tyr Lys Gln Asp His Ser Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu
            100                 105                 110

Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser
        115                 120                 125

Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu
    130                 135                 140

Pro Ser Gly Lys Ala Glu Tyr His Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp
145                 150                 155                 160

Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly
                165                 170                 175

His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu
            180                 185                 190

Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu
        195                 200                 205

Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Gly Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala
    210                 215                 220

Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys
225                 230                 235                 240

Ile Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln
                245                 250
```

<210> 16
<211> 263
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 16

```
Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp
1               5                   10                  15

Ile Gly Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys
            20                  25                  30
```

```
Asp Lys Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Ser Gln Asn
        35                  40                  45

Gly Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Arg Thr Phe Lys Ala
    50                  55                  60

Gly Asp Lys Asp Asn Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys
65                  70                  75                  80

Ile Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu
                85                  90                  95

Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser
            100                 105                 110

Ala Leu Thr Ala Leu Gln Thr Glu Gln Val Gln Asp Ser Glu His Ser
        115                 120                 125

Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Val Gly
    130                 135                 140

Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu Pro Lys Asp Val Met Ala Thr Tyr
145                 150                 155                 160

Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr
                165                 170                 175

Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu
            180                 185                 190

Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro
        195                 200                 205

Asp Glu Lys His His Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln
    210                 215                 220

Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Gln Ala Gln
225                 230                 235                 240

Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val Glu Thr Ala Asn Gly Ile Arg His
                245                 250                 255

Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
            260
```

<210> 17
<211> 255
<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 17

```
Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu
1               5                  10                  15

Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln
            20                  25                  30

Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu
        35                  40                  45

Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn
    50                  55                  60

Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg
65                  70                  75                  80

Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe
                85                  90                  95

Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Leu Gln Thr Glu
            100                 105                 110

Gln Glu Gln Asp Pro Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Arg
        115                 120                 125

Phe Lys Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu
    130                 135                 140

Pro Lys Asp Val Met Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp
145                 150                 155                 160

Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln
                165                 170                 175

Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Glu
            180                 185                 190

Leu Ala Thr Ala Tyr Ile Lys Pro Asp Glu Lys His His Ala Val Ile
        195                 200                 205

Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Asp Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu
    210                 215                 220

Gly Ile Phe Gly Gly Gln Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val
225                 230                 235                 240
```

```
Glu Thr Ala Asn Gly Ile His His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
                245                 250                 255


<210>  18
<211>  255
<212>  PRT
<213>  Neisseria meningitidis (grupo B)

<400>  18

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu
1               5                   10                  15


Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln
            20                  25                  30


Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu
        35                  40                  45


Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn
    50                  55                  60


Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg
65                  70                  75                  80


Gln Ile Glu Val Asp Gly Lys Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe
                85                  90                  95


Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Leu Gln Thr Glu
            100                 105                 110


Gln Val Gln Asp Ser Glu Asp Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln
        115                 120                 125


Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu
    130                 135                 140


Pro Lys Gly Gly Ser Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp
145                 150                 155                 160


Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln
                165                 170                 175


Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Glu
            180                 185                 190


Leu Ala Thr Ala Tyr Ile Lys Pro Asp Glu Lys Arg His Ala Val Ile
        195                 200                 205
```

```
Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Asp Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu
    210                 215                 220

Gly Ile Phe Gly Gly Gln Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val
225                 230                 235                 240

Glu Thr Ala Asn Gly Ile His His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
                245                 250                 255
```

<210> 19
<211> 255
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 19

```
Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Val Leu
1               5                   10                  15

Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln
            20                  25                  30

Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu
        35                  40                  45

Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn
    50                  55                  60

Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg
65                  70                  75                  80

Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe
                85                  90                  95

Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Leu Gln Thr Glu
            100                 105                 110

Gln Val Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln
        115                 120                 125

Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu
    130                 135                 140

Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp
145                 150                 155                 160

Asp Ala Ser Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln
                165                 170                 175
```

```
Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp
            180                 185                 190

Leu Ala Ala Ser Asp Ile Lys Pro Asp Lys Lys Arg His Ala Val Ile
        195                 200                 205

Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu
    210                 215                 220

Gly Ile Phe Gly Gly Gln Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val
225                 230                 235                 240

Glu Thr Ala Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
                245                 250                 255
```

<210> 20
<211> 255
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 20

```
Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu
1               5                   10                  15

Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln
            20                  25                  30

Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu
        35                  40                  45

Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn
    50                  55                  60

Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg
65                  70                  75                  80

Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe
                85                  90                  95

Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Phe Gln Thr Glu
            100                 105                 110

Gln Ile Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln
        115                 120                 125

Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu
    130                 135                 140
```

```
Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp
145                 150                 155                 160

Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln
                165                 170                 175

Gly Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp
            180                 185                 190

Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp Gly Lys Arg His Ala Val Ile
        195                 200                 205

Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu
    210                 215                 220

Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val
225                 230                 235                 240

Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
                245                 250                 255
```

<210> 21
<211> 263
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 21

```
Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp
1               5                   10                  15

Ile Gly Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys
            20                  25                  30

Asp Lys Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Ser Gln Asn
        35                  40                  45

Gly Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Arg Thr Phe Lys Ala
    50                  55                  60

Gly Asp Lys Asp Asn Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys
65                  70                  75                  80

Ile Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu
                85                  90                  95

Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser
            100                 105                 110
```

Ala Leu Thr Ala Leu Gln Thr Glu Gln Val Gln Asp Ser Glu His Ser
115 120 125

Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Val Gly
130 135 140

Glu His Thr Ser Phe Gly Lys Leu Pro Lys Asp Val Met Ala Thr Tyr
145 150 155 160

Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr
165 170 175

Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu
180 185 190

Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro
195 200 205

Asp Glu Lys His His Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln
210 215 220

Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Gln Ala Gln
225 230 235 240

Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val Glu Thr Ala Asn Gly Ile Arg His
245 250 255

Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
260

<210> 22
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótido sintética: Cebador directo

<400> 22
tgccatatga gcagcggaag cggaag 26

<210> 23
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótido sintética: Cebador inverso

<400> 23
cggatcccta ctgtttgccg gcgatgc 27

<210> 24
<211> 49
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótido sintética: Cebador directo

<400> 24
tttcttcccg ggaaggagat atacatatgt gcagcagcgg aggcggcgg 49

<210> 25
<211> 38
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótido sintética: Cebador inverso

<400> 25
tttcttgctc agcattattg cttggcggca agaccgat 38

<210> 26
<211> 46
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótido sintética: Cebador directo

<400> 26
tttcttcccg ggaaggagat atacatatga gcagcggagg cggcgg 46

<210> 27
<211> 38
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótido sintética: Cebador inverso

<400> 27
tttcttgctc agcattattg cttggcggca agaccgat 38

<210> 28
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótido sintética

<400> 28
atgagctctg gaggtggagg aagcgggggc ggtgga 36

<210> 29

<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácido sintética

<400> 29

Met Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 30
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótido sintética

<400> 30
atgagctctg gaagcggaag cgggggcggt gga 33

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácido sintética

<400> 31

Met Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 32
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótido sintética

<400> 32
atgagctctg gaggtggagg a 21

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácido sintética

<400> 33

Met Ser Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 34
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótido sintética

<400> 34
atgagcagcg ggggcggtgg a 21

<210> 35
<211> 28
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 35

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Thr Ala Asp
1 5 10 15

Ile Gly Thr Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro
20 25

<210> 36
<211> 28
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 36

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp
1 5 10 15

Ile Gly Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro
20 25

<210> 37
<211> 27
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 37

Cys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile
1 5 10 15

Gly Thr Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro
20 25

<210> 38
<211> 23
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 38

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu
1 5 10 15

Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro
20

<210> 39
<211> 23
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 39

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Val Leu
1 5 10 15

Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro
20

<210> 40
<211> 23
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 40

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu
1 5 10 15

Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro
20

<210> 41
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácido sintética

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> X es G o V

<400> 41

Met Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Xaa
1 5 10 15

<210> 42
<211> 45

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótido sintética

<400> 42
atgagcagcg gaggcggcgg tgtcgccgcc gacatcggcg cgggg 45

<210> 43
<211> 789
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótido sintética

<400> 43
agctctggag gtggaggaag cgggggcggt ggagttgcag cagacattgg agcaggatta 60

gcagatgcac tgacggcacc gttggatcat aaagacaaag gcttgaaatc gcttacctta 120

gaagattcta tttcacaaaa tggcaccctt accttgtccg cgcaaggcgc tgaacgtact 180

tttaaagccg gtgacaaaga taatagctta aatacaggta aactcaaaaa tgataaaatc 240

tcgcgttttg atttcattcg tcaaatcgaa gtagatggcc aacttattac attagaaagc 300

ggtgaattcc aagtatataa acaatcccat tcagcactta cagcattgca aaccgaacag 360

gtccaagact cagaacattc cggcaaaatg gtagctaaac gtcaattccg catcggtgac 420

attgtcggtg aacatacaag cttcggaaaa ttaccaaaag atgtgatggc gacctatcgc 480

ggtacggcat ttggatcaga tgatgcaggc ggtaaattaa cttatacaat tgactttgca 540

gcaaaacaag gacatggcaa aattgaacat ttaaaatctc ccgaacttaa cgtagatctc 600

gcagcagcag atattaaacc agatgaaaaa caccacgcag tcatttcagg ttcagtttta 660

tacaatcagg cagaaaaagg ttcgtactct ttaggtattt ttggcgggca agctcaagaa 720

gttgcaggta gcgcagaagt agaaacggca aatggcattc gtcacattgg gttagcggcg 780

aaacaataa 789

<210> 44
<211> 262
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácido sintética

<400> 44

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile
1 5 10 15

Gly Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp

```
            20                  25                  30

Lys Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Ser Gln Asn Gly
        35                  40                  45

Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Arg Thr Phe Lys Ala Gly
    50                  55                  60

Asp Lys Asp Asn Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Ile
65                  70                  75                  80

Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile
                85                  90                  95

Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala
            100                 105                 110

Leu Thr Ala Leu Gln Thr Glu Gln Val Gln Asp Ser Glu His Ser Gly
        115                 120                 125

Lys Met Val Ala Lys Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Val Gly Glu
    130                 135                 140

His Thr Ser Phe Gly Lys Leu Pro Lys Asp Val Met Ala Thr Tyr Arg
145                 150                 155                 160

Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr
                165                 170                 175

Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys
            180                 185                 190

Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp
        195                 200                 205

Glu Lys His His Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala
    210                 215                 220

Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Gln Ala Gln Glu
225                 230                 235                 240

Val Ala Gly Ser Ala Glu Val Glu Thr Ala Asn Gly Ile Arg His Ile
                245                 250                 255

Gly Leu Ala Ala Lys Gln
            260
```

<210> 45
<211> 780
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótido sintética

<400> 45
agctctggag gtggaggaag cgggggcggt ggagttgcag cagacattgg agcaggatta 60

gcagatgcac tgacggcacc gttggatcat aaagacaaag gcttgcagtc gcttacctta 120

gatcagtctg tcaggaaaaa tgagaaactt aagttggcgg cgcaaggcgc tgaaaaaact 180

tatggaaacg gtgacagctt aaatacaggt aaactcaaaa atgataaagt ctcgcgtttt 240

gatttcattc gtcaaatcga agtagatggc aagcttatta cattagaaag cggtgaattc 300

caagtatata aacaatccca ttcagcactt acagcattgc aaaccgaaca ggtccaagac 360

tcagaagatt ccggcaaaat ggtagctaaa cgtcaattcc gcatcggtga cattgcgggt 420

gaacatacaa gcttcgacaa attaccaaaa ggcggcagtg cgacctatcg cggtacggca 480

tttggatcag atgatgcagg cggtaaatta acttatacaa ttgactttgc agcaaaacaa 540

ggacatggca aaattgaaca tttaaaatct cccgaactta acgtagagct cgcaaccgca 600

tatattaaac cagatgaaaa acgccacgca gtcatttcag gttcagtttt atacaatcag 660

gacgaaaaag gttcgtactc tttaggtatt tttggcgggc aagctcaaga agttgcaggt 720

agcgcagaag tagaaacggc aaatggcatt caccacattg ggttagcggc gaaacaataa 780

<210> 46
<211> 765
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótido sintética

<400> 46
agctctggag gtggaggagt tgcagcagac attggagcag gattagcaga tgcactgacg 60

gcaccgttgg atcataaaga caaaggcttg cagtcgctta ccttagatca gtctgtcagg 120

aaaaatgaga aacttaagtt ggcggcgcaa ggcgctgaaa aaacttatgg aaacggtgac 180

agcttaaata caggtaaact caaaaatgat aaagtctcgc gttttgattt cattcgtcaa 240

atcgaagtag atggcaagct tattacatta gaaagcggtg aattccaagt atataaacaa 300

tcccattcag cacttacagc attgcaaacc gaacaggtcc aagactcaga agattccggc 360

aaaatggtag ctaaacgtca attccgcatc ggtgacattg cgggtgaaca tacaagcttc 420

gacaaattac caaaaggcgg cagtgcgacc tatcgcggta cggcatttgg atcagatgat 480

gcaggcggta aattaactta tacaattgac tttgcagcaa aacaaggaca tggcaaaatt 540

gaacatttaa aatctcccga acttaacgta gagctcgcaa ccgcatatat taaaccagat 600

gaaaaacgcc acgcagtcat ttcaggttca gttttataca atcaggacga aaaaggttcg 660

tactctttag gtatttttgg cgggcaagct caagaagttg caggtagcgc agaagtagaa 720

acggcaaatg gcattcacca cattgggtta gcggcgaaac aataa 765

<210> 47
<211> 765
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótido sintética

<400> 47
agcagcgggg gcggtggagt tgcagcagac attggagcag gattagcaga tgcactgacg 60

gcaccgttgg atcataaaga caaaggcttg cagtcgctta ccttagatca gtctgtcagg 120

aaaaatgaga aacttaagtt ggcggcgcaa ggcgctgaaa aaacttatgg aaacggtgac 180

agcttaaata caggtaaact caaaaatgat aaagtctcgc gttttgattt cattcgtcaa 240

atcgaagtag atggcaagct tattacatta gaaagcggtg aattccaagt atataaacaa 300

tcccattcag cacttacagc attgcaaacc gaacaggtcc aagactcaga agattccggc 360

aaaatggtag ctaaacgtca attccgcatc ggtgacattg cgggtgaaca tacaagcttc 420

gacaaattac caaaaggcgg cagtgcgacc tatcgcggta cggcatttgg atcagatgat 480

gcaggcggta aattaactta tacaattgac tttgcagcaa aacaaggaca tggcaaaatt 540

gaacatttaa aatctcccga acttaacgta gagctcgcaa ccgcatatat taaaccagat 600

gaaaaacgcc acgcagtcat ttcaggttca gttttataca atcaggacga aaaaggttcg 660

tactctttag gtatttttgg cgggcaagct caagaagttg caggtagcgc agaagtagaa 720

acggcaaatg gcattcacca cattgggtta gcggcgaaac aataa 765

<210> 48
<211> 765
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótido sintética

<400> 48
agcagcggag ggggcggtgt cgccgccgac atcggtgcgg ggcttgccga tgcactaacc 60

gcaccgctcg accataaaga caaaggtttg cagtctttaa cactggatca gtccgtcagg 120

aaaaacgaga aactgaagct ggcggcacaa ggtgcggaaa aaacttatgg aaacggcgac 180

agccttaata cgggcaaatt gaagaacgac aaggtcagcc gcttcgactt tatccgtcaa 240

atcgaagtgg acgggaagct cattaccttg gagagcggag agttccaagt gtacaaacaa 300

agccattccg ccttaaccgc ccttcagacc gagcaagtac aagactcgga ggattccggg 360

aagatggttg cgaaacgcca gttcagaatc ggcgacatag cgggcgaaca tacatctttt 420

gacaagcttc ccaaaggcgg cagtgcgaca tatcgcggga cggcgttcgg ttcagacgat 480

gctggcggaa aactgaccta tactatagat ttcgccgcca agcagggaca cggcaaaatc 540

gaacatttga aatcgcccga actcaatgtc gagcttgcca ccgcctatat caagccggat 600

gaaaaacgcc atgccgttat cagcggttcc gtcctttaca accaagacga gaaaggcagt 660

tactccctcg gtatctttgg cgggcaagcc caggaagttg ccggcagcgc ggaagtggaa 720

accgcaaacg gcatacacca tatcggtctt gccgccaagc agtaa 765

<210> 49
<211> 254
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácido sintética

<400> 49

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu Ala
1 5 10 15

Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln Ser
20 25 30

Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu Ala
35 40 45

Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn Thr
50 55 60

Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg Gln
65 70 75 80

Ile Glu Val Asp Gly Lys Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe Gln
85 90 95

Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Leu Gln Thr Glu Gln
100 105 110

Val Gln Asp Ser Glu Asp Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln Phe
115 120 125

Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu Pro
130 135 140

Lys Gly Gly Ser Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp Asp
145 150 155 160

Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly
165 170 175

His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Glu Leu
180 185 190

Ala Thr Ala Tyr Ile Lys Pro Asp Glu Lys Arg His Ala Val Ile Ser
195 200 205

Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Asp Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu Gly
210 215 220

Ile Phe Gly Gly Gln Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val Glu
225 230 235 240

Thr Ala Asn Gly Ile His His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
245 250

<210> 50
<211> 259
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácido sintética

<400> 50

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile
1 5 10 15

Gly Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp
20 25 30

Lys Gly Leu Gln Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu
35 40 45

Lys Leu Lys Leu Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly
50 55 60

Asp Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe
65 70 75 80

Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Lys Leu Ile Thr Leu Glu
85 90 95

```
Ser Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala
            100                 105                 110

Leu Gln Thr Glu Gln Val Gln Asp Ser Glu Asp Ser Gly Lys Met Val
        115                 120                 125

Ala Lys Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser
    130                 135                 140

Phe Asp Lys Leu Pro Lys Gly Gly Ser Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala
145                 150                 155                 160

Phe Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe
                165                 170                 175

Ala Ala Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu
            180                 185                 190

Leu Asn Val Glu Leu Ala Thr Ala Tyr Ile Lys Pro Asp Glu Lys Arg
        195                 200                 205

His Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Asp Glu Lys Gly
    210                 215                 220

Ser Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Gln Ala Gln Glu Val Ala Gly
225                 230                 235                 240

Ser Ala Glu Val Glu Thr Ala Asn Gly Ile His His Ile Gly Leu Ala
                245                 250                 255

Ala Lys Gln
```

<210> 51
<211> 789
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótido sintética

<400> 51

```
agcagcggag gcggcggaag cggaggcggc ggtgtcgccg ccgacatcgg cgcggggctt       60

gccgatgcac taaccgcacc gctcgaccat aaagacaaag gtttgaaatc cctgacattg      120

gaagactcca tttcccaaaa cggaacactg accctgtcgg cacaaggtgc ggaaagaact      180

ttcaaagccg gcgacaaaga caacagtctc aacacaggca aactgaagaa cgacaaaatc      240

agccgcttcg actttatccg tcaaatcgaa gtggacgggc agctcattac cttggagagc      300
```

ggagagttcc aagtgtacaa acaaagccat tccgccttaa ccgcccttca gaccgagcaa 360

gtacaagact cggagcattc cgggaagatg gttgcgaaac gccagttcag aatcggcgac 420

atagtgggcg aacatacatc ttttggcaag cttcccaaag acgtcatggc gacatatcgc 480

gggacggcgt tcggttcaga cgatgccggc ggaaaactga cctacaccat agatttcgcc 540

gccaagcagg gacacggcaa aatcgaacat ttgaaatcgc cagaactcaa tgttgacctg 600

gccgccgccg atatcaagcc ggatgaaaaa caccatgccg tcatcagcgg ttccgtcctt 660

tacaaccaag ccgagaaagg cagttactct ctaggcatct ttggcgggca agcccaggaa 720

gttgccggca gcgcggaagt ggaaaccgca aacggcatac gccatatcgg tcttgccgcc 780

aagcaataa 789

<210> 52
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótido sintética

<400> 52
atgagcagcg gaggcggcgg tgtcgccgcc gacatcggcg cggtg 45

<210> 53
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótido sintética

<400> 53
atgagcagcg gaggggcgg tgtcgccgcc gacatcggtg cgggg 45

<210> 54
<211> 783
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótido sintética

<400> 54
agcagcggaa gcggaagcgg aggcggcggt gtcgccgccg acatcggcac agggcttgcc 60

gatgcactaa ctgcgccgct cgaccataaa gacaaaggtt tgaaatccct gacattggaa 120

gactccattt cccaaaacgg aacactgacc ctgtcggcac aaggtgcgga aaaaactttc 180

aaagtcggcg acaaagacaa cagtctcaat acaggcaaat tgaagaacga caaaatcagc 240

cgcttcgact ttgtgcaaaa aatcgaagtg gacggacaaa ccatcacgct ggcaagcggc 300

gaatttcaaa tatacaaaca ggaccactcc gccgtcgttg ccctacagat tgaaaaaatc 360

aacaaccccg acaaaatcga cagcctgata aaccaacgct ccttccttgt cagcggtttg 420

ggcggagaac ataccgcctt caaccaactg cccagcggca aagccgagta tcacggcaaa 480

gcattcagct ccgacgatgc cggcggaaaa ctgacctata ccatagattt tgccgccaaa 540

cagggacacg gcaaaatcga acacctgaaa acacccgagc agaatgtcga gcttgcctcc 600

gccgaactca aagcagatga aaaatcacac gccgtcattt tgggcgacac gcgctacggc 660

agcgaagaaa aaggcactta ccacctcgct cttttcggcg accgagccca agaaatcgcc 720

ggctcggcaa ccgtgaagat aagggaaaag gttcacgaaa tcggcatcgc cggcaaacag 780

tag 783

<210> 55
<211> 260
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácido sintética

<400> 55

Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly
1 5 10 15

Thr Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys
20 25 30

Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Ser Gln Asn Gly Thr
35 40 45

Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Phe Lys Val Gly Asp
50 55 60

Lys Asp Asn Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Ile Ser
65 70 75 80

Arg Phe Asp Phe Val Gln Lys Ile Glu Val Asp Gly Gln Thr Ile Thr
85 90 95

Leu Ala Ser Gly Glu Phe Gln Ile Tyr Lys Gln Asp His Ser Ala Val
100 105 110

Val Ala Leu Gln Ile Glu Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile Asp Ser
115 120 125

Leu Ile Asn Gln Arg Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly Glu His
130 135 140

```
Thr Ala Phe Asn Gln Leu Pro Ser Gly Lys Ala Glu Tyr His Gly Lys
145                 150                 155                 160

Ala Phe Ser Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp
                165                 170                 175

Phe Ala Ala Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Thr Pro
            180                 185                 190

Glu Gln Asn Val Glu Leu Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys
        195                 200                 205

Ser His Ala Val Ile Leu Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Ser Glu Glu Lys
    210                 215                 220

Gly Thr Tyr His Leu Ala Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala
225                 230                 235                 240

Gly Ser Ala Thr Val Lys Ile Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile
                245                 250                 255

Ala Gly Lys Gln
            260
```

<210> 56
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácido sintética

<400> 56

```
Ser Gly Gly Gly Gly
1               5
```

<210> 57
<211> 259
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácido sintética

<400> 57

```
Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Thr Ala Asp Ile
1               5                   10                  15

Gly Thr Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp
            20                  25                  30
```

```
Lys Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Ser Gln Asn Gly
        35                  40                  45

Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly
    50                  55                  60

Asp Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe
65                  70                  75                  80

Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu
                85                  90                  95

Ser Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala
            100                 105                 110

Leu Gln Thr Glu Gln Glu Gln Asp Pro Glu His Ser Glu Lys Met Val
        115                 120                 125

Ala Lys Arg Arg Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser
    130                 135                 140

Phe Asp Lys Leu Pro Lys Asp Val Met Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala
145                 150                 155                 160

Phe Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe
                165                 170                 175

Ala Ala Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu
            180                 185                 190

Leu Asn Val Asp Leu Ala Val Ala Tyr Ile Lys Pro Asp Glu Lys His
        195                 200                 205

His Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Asp Glu Lys Gly
    210                 215                 220

Ser Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Glu Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly
225                 230                 235                 240

Ser Ala Glu Val Glu Thr Ala Asn Gly Ile His His Ile Gly Leu Ala
                245                 250                 255

Ala Lys Gln
```

<210> 58

<211> 260
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 58

```
Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Thr Ala Asp
1               5                  10                  15

Ile Gly Thr Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys
            20                  25                  30

Asp Lys Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Ser Gln Asn
        35                  40                  45

Gly Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn
    50                  55                  60

Gly Asp Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg
65                  70                  75                  80

Phe Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu
                85                  90                  95

Glu Ser Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr
            100                 105                 110

Ala Leu Gln Thr Glu Gln Glu Gln Asp Pro Glu His Ser Glu Lys Met
        115                 120                 125

Val Ala Lys Arg Arg Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr
    130                 135                 140

Ser Phe Asp Lys Leu Pro Lys Asp Val Met Ala Thr Tyr Arg Gly Thr
145                 150                 155                 160

Ala Phe Gly Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp
                165                 170                 175

Phe Ala Ala Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro
            180                 185                 190

Glu Leu Asn Val Asp Leu Ala Val Ala Tyr Ile Lys Pro Asp Glu Lys
        195                 200                 205

His His Ala Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Asp Glu Lys
    210                 215                 220

Gly Ser Tyr Ser Leu Gly Ile Phe Gly Glu Lys Ala Gln Glu Val Ala
```

225 230 235 240

Gly Ser Ala Glu Val Glu Thr Ala Asn Gly Ile His His Ile Gly Leu
245 250 255

Ala Ala Lys Gln
260

<210> 59
<211> 255
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 59

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu
1 5 10 15

Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln
20 25 30

Ser Leu Ile Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu
35 40 45

Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn
50 55 60

Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg
65 70 75 80

Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe
85 90 95

Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Leu Gln Thr Glu
100 105 110

Gln Val Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln
115 120 125

Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu
130 135 140

Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Ser Ser Asp
145 150 155 160

Asp Ala Gly Gly Lys Leu Ile Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln
165 170 175

Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp

180 185 190

Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp Glu Lys His His Ala Val Ile
195 200 205

Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu
210 215 220

Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val
225 230 235 240

Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
245 250 255

<210> 60
<211> 255
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 60

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu
1 5 10 15

Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln
20 25 30

Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu
35 40 45

Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn
50 55 60

Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg
65 70 75 80

Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe
85 90 95

Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Leu Gln Thr Glu
100 105 110

Gln Val Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln
115 120 125

Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu
130 135 140

Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp

145 150 155 160

Asp Ala Ser Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln
165 170 175

Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp
180 185 190

Leu Ala Ala Ser Asp Ile Lys Pro Asp Lys Lys Arg His Ala Val Ile
195 200 205

Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu
210 215 220

Gly Ile Phe Gly Gly Gln Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val
225 230 235 240

Glu Thr Ala Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
245 250 255

<210> 61
<211> 768
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico sintética

<400> 61
ggcagcagcg gaggcggcgg tgtcgccgcc gacatcggcg cggtgcttgc cgatgcacta 60

accgcaccgc tcgaccataa agacaaaagt ttgcagtctt tgacgctgga tcagtccgtc 120

aggaaaaacg agaaactgaa gctggcggca caaggtgcgg aaaaaactta tggaaacggc 180

gacagcctca atacgggcaa attgaagaac gacaaggtca gccgcttcga ctttatccgt 240

caaatcgaag tggacgggca gctcattacc ttggagagcg gagagttcca agtgtacaaa 300

caaagccatt ccgccttaac cgcccttcag accgagcaag tacaagattc ggagcattca 360

gggaagatgg ttgcgaaacg ccagttcaga atcggcgata tagcgggtga acatacatct 420

tttgacaagc ttcccgaagg cggcagggcg acatatcgcg ggacggcatt cggttcagac 480

gatgccagtg gaaaactgac ctacaccata gatttcgccg ccaagcaggg acacggcaaa 540

atcgaacatt tgaaatcgcc agaactcaat gttgacctgg ccgcctccga tatcaagccg 600

gataaaaaac gccatgccgt catcagcggt tccgtccttt acaaccaagc cgagaaaggc 660

agttactctc taggcatctt tggcgggcaa gcccaggaag ttgccggcag cgcagaagtg 720

gaaaccgcaa acggcatacg ccatatcggt cttgccgcca agcagtaa 768

<210> 62
<211> 255
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácido sintética

<400> 62

```
Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Val Leu
1               5                   10                  15


Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln
            20                  25                  30


Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu
        35                  40                  45


Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn
    50                  55                  60


Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg
65                  70                  75                  80


Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe
                85                  90                  95


Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Leu Gln Thr Glu
            100                 105                 110


Gln Val Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln
        115                 120                 125


Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu
    130                 135                 140


Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp
145                 150                 155                 160


Asp Ala Ser Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln
                165                 170                 175


Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp
            180                 185                 190


Leu Ala Ala Ser Asp Ile Lys Pro Asp Lys Lys Arg His Ala Val Ile
        195                 200                 205


Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu
```

210 215 220

Gly Ile Phe Gly Gly Gln Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val
225 230 235 240

Glu Thr Ala Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
245 250 255

<210> 63
<211> 765
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico sintética

<400> 63
ggcagcagcg gaggcggcgg tgtcgccgcc gacatcggcg cggggcttgc cgatgcacta 60

accgcaccgc tcgaccataa agacaaaagt ttgcagtctt tgacgctgga tcagtccgtc 120

aggaaaaacg agaaactgaa gctggcggca caaggtgcgg aaaaaactta tggaaacggc 180

gacagcctca atacgggcaa attgaagaac gacaaggtca gccgcttcga ctttatccgt 240

caaatcgaag tggacgggca gctcattacc ttggagagcg gagagttcca aatatacaaa 300

caggaccact ccgccgtcgt tgccctacag attgaaaaaa tcaacaaccc cgacaaaatc 360

gacagcctga taaaccaacg ctccttcctt gtcagcggtt tgggtggaga acataccgcc 420

ttcaaccaac tgcccagcgg caaagccgag tatcacggca aagcattcag ctccgacgat 480

gctggcggaa aactgaccta taccatagat ttcgccgcca aacagggaca cggcaaaatc 540

gaacacttga aaacacccga gcaaaatgtc gagcttgcct ccgccgaact caaagcagat 600

gaaaaatcac acgccgtcat tttgggcgac acgcgctacg gcggcgaaga aaaaggcact 660

taccacctcg ccctttcgg cgaccgcgcc caagaaatcg ccggctcggc aaccgtgaag 720

ataagggaaa aggttcacga aatcggcatc gccggcaaac agtaa 765

<210> 64
<211> 254
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácido sintética

<400> 64

Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu
1 5 10 15

Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln
20 25 30

```
Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu
        35                  40                  45

Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn
    50                  55                  60

Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg
65                  70                  75                  80

Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe
                85                  90                  95

Gln Ile Tyr Lys Gln Asp His Ser Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu
            100                 105                 110

Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser
        115                 120                 125

Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu
    130                 135                 140

Pro Ser Gly Lys Ala Glu Tyr His Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp
145                 150                 155                 160

Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly
                165                 170                 175

His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu
            180                 185                 190

Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu
        195                 200                 205

Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Gly Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala
    210                 215                 220

Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys
225                 230                 235                 240

Ile Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln
                245                 250
```

<210> 65
<211> 786
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico sintética

<400> 65
atgagctctg gaagcggaag cgggggcggt ggagttgcag cagacattgg aacaggatta 60

gcagatgcac tgacggcacc gttggatcat aaagacaaag gcttgaaatc gcttacctta 120

gaagattcta tttcacaaaa tggcaccctt accttgtccg cgcaaggcgc tgaaaaaact 180

tttaaagtcg gtgacaaaga taatagctta aatacaggta aactcaaaaa tgataaaatc 240

tcgcgttttg atttcgtgca aaaaatcgaa gtagatggcc aaaccattac attagcaagc 300

ggtgaattcc aaatatataa acaagaccat tcagcagtcg ttgcattgca aattgaaaaa 360

atcaacaacc ccgacaaaat cgacagcctg ataaaccaac gttccttcct tgtcagcggt 420

ttgggcggtg aacatacagc cttcaaccaa ttaccaagcg gcaaagcgga gtatcacggt 480

aaagcattta gctcagatga tgcaggcggt aaattaactt atacaattga ctttgcagca 540

aaacaaggac atggcaaaat tgaacattta aaaacacccg aacagaacgt agagctcgca 600

tccgcagaac tcaaagcaga tgaaaaatca cacgcagtca ttttgggtga cacgcgctac 660

ggcagcgaag aaaaaggtac ttaccactta gctctttttg gcgaccgagc tcaagaaatc 720

gcaggtagcg caaccgtaaa gataagggaa aaggttcacg aaattgggat cgcgggcaaa 780

caataa 786

<210> 66
<211> 258
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácido sintética

<400> 66

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile
1 5 10 15

Gly Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp
20 25 30

Lys Ser Leu Gln Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu
35 40 45

Lys Leu Lys Leu Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly
50 55 60

Asp Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe
65 70 75 80

```
Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Thr Ile Thr Leu Ala
                85                  90                  95

Ser Gly Glu Phe Gln Ile Tyr Lys Gln Asn His Ser Ala Val Val Ala
            100                 105                 110

Leu Gln Ile Glu Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile Asp Ser Leu Ile
        115                 120                 125

Asn Gln Arg Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly Glu His Thr Ala
    130                 135                 140

Phe Asn Gln Leu Pro Asp Gly Lys Ala Glu Tyr His Gly Lys Ala Phe
145                 150                 155                 160

Ser Ser Asp Asp Pro Asn Gly Arg Leu His Tyr Ser Ile Asp Phe Thr
                165                 170                 175

Lys Lys Gln Gly Tyr Gly Arg Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln
            180                 185                 190

Asn Val Glu Leu Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His
        195                 200                 205

Ala Val Ile Leu Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Gly Glu Glu Lys Gly Thr
    210                 215                 220

Tyr His Leu Ala Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser
225                 230                 235                 240

Ala Thr Val Lys Ile Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly
                245                 250                 255

Lys Gln
```

<210> 67
<211> 780
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico sintética

<400> 67

```
atgagctctg gaggtggagg aagcgggggc ggtggagttg cagcagacat tggagcagga       60

ttagcagatg cactgacggc accgttggat cataaagaca aaagtttgca gtcgcttacc      120

ttagatcagt ctgtcaggaa aaatgagaaa cttaagttgg cggcgcaagg cgctgaaaaa      180
```

acttatggaa acggtgacag cttaaataca ggtaaactca aaaatgataa agtctcgcgt 240

tttgatttca ttcgtcaaat cgaagtagat ggccaaacca ttacattagc aagcggtgaa 300

ttccaaatat ataaacaaaa ccattcagca gtcgttgcat tgcaaattga aaaaatcaac 360

aaccccgaca aaatcgacag cctgataaac caacgttcct tccttgtcag cggtttgggc 420

ggtgaacata cagccttcaa ccaattacca gacggcaaag cggagtatca cggtaaagca 480

tttagctcag atgatccgaa cggtaggtta cactattcca ttgactttac caaaaaacaa 540

ggatacggca gaattgaaca tttaaaaacg cccgaacaga acgtagagct cgcatccgca 600

gaactcaaag cagatgaaaa atcacacgca gtcattttgg gtgacacgcg ctacggcggc 660

gaagaaaaag gtacttacca cttagccctt tttggcgacc gcgctcaaga aatcgcaggt 720

agcgcaaccg taaagataag ggaaaaggtt cacgaaattg ggatcgcggg caaacaataa 780

<210> 68
<211> 253
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácido sintética

<400> 68

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu Ala
1 5 10 15

Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln Ser
20 25 30

Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu Ala
35 40 45

Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn Thr
50 55 60

Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg Gln
65 70 75 80

Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe Gln
85 90 95

Ile Tyr Lys Gln Asp His Ser Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu Lys
100 105 110

Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser Phe
115 120 125

Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu Pro
130 135 140

Ser Gly Lys Ala Glu Tyr His Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp Ala
145 150 155 160

Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly His
165 170 175

Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu Ala
180 185 190

Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu Gly
195 200 205

Asp Thr Arg Tyr Gly Gly Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala Leu
210 215 220

Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys Ile
225 230 235 240

Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln
245 250

<210> 69
<211> 765
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico sintética

<400> 69
atgagctctg gaggtggagg agttgcagca gacattggag caggattagc agatgcactg 60

acggcaccgt tggatcataa agacaaaagt ttgcagtcgc ttaccttaga tcagtctgtc 120

aggaaaaatg agaaacttaa gttggcggcg caaggcgctg aaaaaactta tggaaacggt 180

gacagcttaa atacaggtaa actcaaaaat gataaagtct cgcgttttga tttcattcgt 240

caaatcgaag tagatggcca acttattaca ttagaaagcg gtgaattcca aatatataaa 300

caagaccatt cagcagtcgt tgcattgcaa attgaaaaaa tcaacaaccc cgacaaaatc 360

gacagcctga taaaccaacg ttccttcctt gtcagcggtt tgggcggtga acatacagcc 420

ttcaaccaat taccaagcgg caaagcggag tatcacggta aagcatttag ctcagatgat 480

gcaggcggta aattaactta tacaattgac tttgcagcaa aacaaggaca tggcaaaatt 540

gaacatttaa aaacacccga acagaacgta gagctcgcat ccgcagaact caaagcagat 600

gaaaaatcac acgcagtcat tttgggtgac acgcgctacg gcggcgaaga aaaaggtact 660

taccacttag ctctttttgg cgaccgagct caagaaatcg caggtagcgc aaccgtaaag 720

ataagggaaa aggttcacga aattgggatc gcgggcaaac aataa 765

<210> 70
<211> 255
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 70

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu
1 5 10 15

Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln
20 25 30

Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu
35 40 45

Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn
50 55 60

Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg
65 70 75 80

Gln Ile Glu Val Asp Gly Lys Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe
85 90 95

Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Leu Gln Thr Glu
100 105 110

Gln Val Gln Asp Ser Glu Asp Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln
115 120 125

Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu
130 135 140

Pro Lys Gly Gly Ser Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp
145 150 155 160

Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln
165 170 175

Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu
180 185 190

Leu Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile
195 200 205

Leu Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Gly Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu
210 215 220

Ala Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val
225 230 235 240

Lys Ile Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln
245 250 255

<210> 71
<211> 254
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácido sintética

<400> 71

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu Ala
1 5 10 15

Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln Ser
20 25 30

Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu Ala
35 40 45

Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn Thr
50 55 60

Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg Gln
65 70 75 80

Ile Glu Val Asp Gly Lys Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe Gln
85 90 95

Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Leu Gln Thr Glu Gln
100 105 110

Val Gln Asp Ser Glu Asp Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln Phe
115 120 125

Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu Pro
130 135 140

Lys Gly Gly Ser Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp Asp
145 150 155 160

```
Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly
                165                 170                 175

His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu
            180                 185                 190

Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu
        195                 200                 205

Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Gly Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala
    210                 215                 220

Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys
225                 230                 235                 240

Ile Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln
                245                 250
```

<210> 72
<211> 768
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico sintética

<400> 72

```
atgagcagcg gaggggggcgg tgtcgccgcc gacatcggtg cggggcttgc cgatgcacta       60

accgcaccgc tcgaccataa agacaaaggt ttgcagtctt taacgctgga tcagtccgtc      120

aggaaaaacg agaaactgaa gctggcggca caaggtgcgg aaaaaactta tggaaacggc      180

gacagcctta atacgggcaa attgaagaac gacaaggtca gccgcttcga ctttatccgt      240

caaatcgaag tggacgggaa gctcattacc ttggagagcg gagagttcca agtgtacaaa      300

caaagccatt ccgccttaac cgcccttcag accgagcaag tacaagactc ggaggattcc      360

gggaagatgg ttgcgaaacg ccagttcaga atcggcgaca tagcgggcga acatacatct      420

tttgacaagc ttcccaaagg cggcagtgcg acatatcgcg ggacggcgtt cggttcagac      480

gatgctggcg gaaaactgac ctatactata gatttcgccg ccaaacaggg acacggcaaa      540

atcgaacact tgaaaacacc cgagcaaaat gtcgagcttg cctccgccga actcaaagca      600

gatgaaaaat cacacgccgt cattttgggc gacacgcgct acggcggcga agaaaaaggc      660

acttaccacc tcgccctttt cggcgaccgc gcccaagaaa tcgccggctc ggcaaccgtg      720

aagataaggg aaaaggttca cgaaatcggc atcgccggca aacagtaa                  768
```

<210> 73
<211> 786
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico sintética

<400> 73
atgtccagcg gttcaggcag cggcggtgga ggcgtggcag cagatatcgg aacaggttta 60

gcagatgctc tgacagcacc cttagatcac aaagacaaag gacttaaatc actgacattg 120

gaagattcta tctcgcaaaa tggtactctc actctttcag cccaaggcgc agaaaaaaca 180

tttaaagtag gcgataaaga taactcctta aatacaggta aattaaaaaa tgacaaaatc 240

tcacggtttg atttcgttca gaaaattgaa gtagatggac aaacgattac attagcaagc 300

ggcgaattcc aaatttataa acaagaccat tcagcagtag tagcattaca aatcgaaaaa 360

attaacaacc cggacaaaat tgattctctt attaaccaac gctcttttct cgtatcagga 420

cttggtggtg aacatacagc gtttaatcaa ctgccgtcag gaaaagcaga atatcatggt 480

aaagcatttt catcagacga cgcaggtggc aaactgacct atactattga ctttgcagca 540

aaacagggac atggaaaaat tgaacattta aaaacacccg aacagaacgt agaactggcc 600

tcagcagaat tgaaagctga tgaaaaatcc catgcagtaa ttttaggcga tacacgttac 660

ggtagcgaag aaaaaggtac atatcactta gctctttttg gcgatcgtgc tcaagaaatt 720

gctggttccg caacagttaa aatccgtgaa aaagtacatg aaatcggcat tgcaggtaaa 780

caataa 786

<210> 74
<211> 262
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 74

Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp
1 5 10 15

Ile Gly Thr Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys
20 25 30

Asp Lys Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Pro Gln Asn
35 40 45

Gly Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Phe Lys Ala
50 55 60

Gly Asp Lys Asp Asn Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys
65 70 75 80

Ile Ser Arg Phe Asp Phe Val Gln Lys Ile Glu Val Asp Gly Gln Thr

85 90 95

Ile Thr Leu Ala Ser Gly Glu Phe Gln Ile Tyr Lys Gln Asn His Ser
100 105 110

Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile
115 120 125

Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly
130 135 140

Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu Pro Gly Asp Lys Ala Glu Tyr His
145 150 155 160

Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp Pro Asn Gly Arg Leu His Tyr Thr
165 170 175

Ile Asp Phe Thr Asn Lys Gln Gly Tyr Gly Arg Ile Glu His Leu Lys
180 185 190

Thr Pro Glu Leu Asn Val Asp Leu Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp
195 200 205

Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Ser Glu
210 215 220

Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu
225 230 235 240

Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys Ile Gly Glu Lys Val His Glu Ile
245 250 255

Gly Ile Ala Gly Lys Gln
260

<210> 75
<211> 254
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácido sintética

<400> 75

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Val Leu Ala
1 5 10 15

Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Ser Leu Gln Ser
20 25 30

```
Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu Ala
        35                  40                  45

Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn Thr
    50                  55                  60

Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg Gln
65                  70                  75                  80

Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe Gln
                85                  90                  95

Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Leu Gln Thr Glu Gln
            100                 105                 110

Val Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln Phe
        115                 120                 125

Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu Pro
    130                 135                 140

Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp Asp
145                 150                 155                 160

Ala Ser Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly
                165                 170                 175

His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp Leu
            180                 185                 190

Ala Ala Ser Asp Ile Lys Pro Asp Lys Lys Arg His Ala Val Ile Ser
        195                 200                 205

Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu Gly
    210                 215                 220

Ile Phe Gly Gly Gln Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val Glu
225                 230                 235                 240

Thr Ala Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
                245                 250
```

<210> 76
<211> 258
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácido sintética

<400> 76

```
Cys Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Thr Gly
1               5                   10                  15

Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu
            20                  25                  30

Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Ser Gln Asn Gly Thr Leu Thr
        35                  40                  45

Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Phe Lys Val Gly Asp Lys Asp
    50                  55                  60

Asn Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Ile Ser Arg Phe
65                  70                  75                  80

Asp Phe Val Gln Lys Ile Glu Val Asp Gly Gln Thr Ile Thr Leu Ala
                85                  90                  95

Ser Gly Glu Phe Gln Ile Tyr Lys Gln Asp His Ser Ala Val Val Ala
            100                 105                 110

Leu Gln Ile Glu Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile Asp Ser Leu Ile
        115                 120                 125

Asn Gln Arg Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly Glu His Thr Ala
    130                 135                 140

Phe Asn Gln Leu Pro Ser Gly Lys Ala Glu Tyr His Gly Lys Ala Phe
145                 150                 155                 160

Ser Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala
                165                 170                 175

Ala Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln
            180                 185                 190

Asn Val Glu Leu Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His
        195                 200                 205

Ala Val Ile Leu Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Ser Glu Glu Lys Gly Thr
    210                 215                 220

Tyr His Leu Ala Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser
225                 230                 235                 240
```

Ala Thr Val Lys Ile Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly
245 250 255

Lys Gln

<210> 77
<211> 257
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácido sintética

<400> 77

Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Thr Gly Leu
1 5 10 15

Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Lys
20 25 30

Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Ser Gln Asn Gly Thr Leu Thr Leu
35 40 45

Ser Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Phe Lys Val Gly Asp Lys Asp Asn
50 55 60

Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Ile Ser Arg Phe Asp
65 70 75 80

Phe Val Gln Lys Ile Glu Val Asp Gly Gln Thr Ile Thr Leu Ala Ser
85 90 95

Gly Glu Phe Gln Ile Tyr Lys Gln Asp His Ser Ala Val Val Ala Leu
100 105 110

Gln Ile Glu Lys Ile Asn Asn Pro Asp Lys Ile Asp Ser Leu Ile Asn
115 120 125

Gln Arg Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu Gly Gly Glu His Thr Ala Phe
130 135 140

Asn Gln Leu Pro Ser Gly Lys Ala Glu Tyr His Gly Lys Ala Phe Ser
145 150 155 160

Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala
165 170 175

```
Lys Gln Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn
            180                 185                 190

Val Glu Leu Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala
        195                 200                 205

Val Ile Leu Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Ser Glu Glu Lys Gly Thr Tyr
    210                 215                 220

His Leu Ala Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala
225                 230                 235                 240

Thr Val Lys Ile Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys
                245                 250                 255

Gln
```

<210> 78
<211> 255
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácido sintética

<400> 78

```
Cys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu
1               5                   10                  15

Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln
            20                  25                  30

Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu
        35                  40                  45

Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn
    50                  55                  60

Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg
65                  70                  75                  80

Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe
                85                  90                  95

Gln Ile Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Val Ala Leu Gln Thr Glu
            100                 105                 110
```

Gln Ile Asn Asn Ser Asp Lys Ser Gly Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser
115 120 125

Phe Arg Ile Ser Gly Ile Ala Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu
130 135 140

Pro Lys Gly Gly Lys Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Ser Ser Asp
145 150 155 160

Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln
165 170 175

Gly His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu
180 185 190

Leu Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile
195 200 205

Leu Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Gly Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu
210 215 220

Ala Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val
225 230 235 240

Lys Ile Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln
245 250 255

<210> 79
<211> 254
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácido sintética

<400> 79

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu Ala
1 5 10 15

Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln Ser
20 25 30

Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu Ala
35 40 45

Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn Thr
50 55 60

Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg Gln

65 70 75 80

Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe Gln
85 90 95

Ile Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Val Ala Leu Gln Thr Glu Gln
100 105 110

Ile Asn Asn Ser Asp Lys Ser Gly Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser Phe
115 120 125

Arg Ile Ser Gly Ile Ala Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu Pro
130 135 140

Lys Gly Gly Lys Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Ser Ser Asp Asp
145 150 155 160

Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly
165 170 175

His Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Thr Pro Glu Gln Asn Val Glu Leu
180 185 190

Ala Ser Ala Glu Leu Lys Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu
195 200 205

Gly Asp Thr Arg Tyr Gly Gly Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala
210 215 220

Leu Phe Gly Asp Arg Ala Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys
225 230 235 240

Ile Arg Glu Lys Val His Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln
245 250

<210> 80
<211> 254
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácido sintética

<400> 80

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu Ala
1 5 10 15

Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln Ser
20 25 30

```
Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu Ala
        35                  40                  45

Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn Thr
    50                  55                  60

Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg Gln
65                  70                  75                  80

Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe Gln
                85                  90                  95

Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Phe Gln Thr Glu Gln
            100                 105                 110

Ile Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln Phe
        115                 120                 125

Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu Pro
    130                 135                 140

Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp Asp
145                 150                 155                 160

Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly
                165                 170                 175

Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp Leu
            180                 185                 190

Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp Gly Lys Arg His Ala Val Ile Ser
        195                 200                 205

Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu Gly
    210                 215                 220

Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val Lys
225                 230                 235                 240

Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
                245                 250
```

<210> 81
<211> 252
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácido sintética

<400> 81

```
Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu Ala Asp Ala
1               5                   10                  15

Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln Ser Leu Thr
            20                  25                  30

Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu Ala Ala Gln
        35                  40                  45

Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn Thr Gly Lys
    50                  55                  60

Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg Gln Ile Glu
65                  70                  75                  80

Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe Gln Val Tyr
                85                  90                  95

Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Phe Gln Thr Glu Gln Ile Gln
            100                 105                 110

Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln Phe Arg Ile
        115                 120                 125

Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp Lys Leu Pro Glu Gly
    130                 135                 140

Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp Asp Ala Gly
145                 150                 155                 160

Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala Lys Gln Gly Asn Gly
                165                 170                 175

Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Asp Leu Ala Ala
            180                 185                 190

Ala Asp Ile Lys Pro Asp Gly Lys Arg His Ala Val Ile Ser Gly Ser
        195                 200                 205

Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu Gly Ile Phe
    210                 215                 220

Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val Lys Thr Val
225                 230                 235                 240
```

Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys Gln
245 250

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
PC71917A		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/IB2013/051791	6 March 2013 (06-03-2013)	9 March 2012 (09-03-2012)
Applicant		
PFIZER INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 8 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language,** the international search was carried out on the basis of:
      ☒ the international application in the language in which it was filed
      ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).
   c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title,**
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant
   ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract,**
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant
   ☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings,**
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 9a
      ☒ as suggested by the applicant
      ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
      ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
   b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2013/051791

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. (means)

   ☐ on paper

X ☐ in electronic form

   b. (time)

X ☐ in the international application as filed

   ☐ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ 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.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2013/051791

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

see additional sheet(s)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2013/051791

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/095 C07K16/12 C07K14/22
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE Geneseq [Online] 26 November 2009 (2009-11-26), "N. meningitidis NL096 fHBP protein fragment SEQ ID 76.", XP002703350, retrieved from EBI accession no. GSP:AXQ90374 Database accession no. AXQ90374	1,3-6,8, 19-24, 36,38, 39,41, 42, 44-46, 48-51
Y	sequence	9-14, 25-36, 48,49

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 July 2013	14/10/2013

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Madruga, Jaime

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	-& WO 2009/104097 A2 (NOVARTIS AG [CH]; PIZZA MARIAGRAZIA [IT]; SCARSELLI MARIA [IT]; GIULIA) 27 August 2009 (2009-08-27)	1,3-6,8, 19-24, 36,38, 39,41, 42, 44-46, 48-51
Y	page 6 - page 8; claims; sequence 76 page 26	9-14, 25-36, 48,49

X	DATABASE Geneseq [Online] 28 April 2011 (2011-04-28), "Neisseria meningitidis modified fHBP fusion protein SEQ:140.", XP002703351, retrieved from EBI accession no. GSP:AZG10689 Database accession no. AZG10689 sequence	1,3-6,8, 19-24, 36,38, 39,41, 42, 44-46, 48-51
X	-& DATABASE Geneseq [Online] 28 April 2011 (2011-04-28), "Neisseria meningitidis modified fHBP NL096 SEQ:76.", XP002703352, retrieved from EBI accession no. GSP:AZG10625 Database accession no. AZG10625 sequence	1,3-6,8, 19-24, 36,38, 39,41, 42, 44-46, 48-51
X	-& WO 2011/024072 A2 (NOVARTIS AG [CH]; PIZZA MARIAGRAZIA [IT]; SCARSELLI MARIA [IT]; RAPPUO) 3 March 2011 (2011-03-03)	1,3-6,8, 19-24, 36,38, 39,41, 42, 44-46, 48-51
Y	page 32 - page 33; sequence 140.76 page 21 - page 23 page 10 - page 11	9-14, 25-36

X	DATABASE UniProt [Online] 5 May 2009 (2009-05-05), "SubName: Full=Factor H binding protein variant A62_001; SubName: Full=Factor H binding protein variant A62_002; Flags: Fragment;", XP002703353, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:C0JF81 Database accession no. C0JF81	46,47,51
Y	Database entry from: 19-OCT-2011, entry version 7; sequence	48,49

1 -/--

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	-& MURPHY ELLEN ET AL: "Sequence diversity of the factor H binding protein vaccine candidate in epidemiologically relevant strains of serogroup B Neisseria meningitidis", JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS, CHICAGO, IL, vol. 200, no. 3, 1 August 2009 (2009-08-01), pages 379-389, XP002617504, ISSN: 0022-1899, DOI: 10.1086/600141 cited in the application the whole document -----	
A	FLETCHER L D ET AL: "Vaccine potential of the Neisseria meningitidis 2086 lipoprotein", INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MACROBIOLOGY, USA, vol. 72, no. 4, 1 April 2004 (2004-04-01), pages 2088-2100, XP002308110, ISSN: 0019-9567, DOI: 10.1128/IAI.72.4.2088-2100.2004 cited in the application the whole document -----	1-51
X,P	WO 2012/032489 A1 (WYETH LLC [US]; ANDERSON ANNALIESA SYBIL [US]; HOISETH SUSAN KAY [US];) 15 March 2012 (2012-03-15) the whole document -----	1-51
Y	WO 03/063766 A2 (WYETH CORP [US]; ZLOTNICK GARY W [US]; FLETCHER LEAH D [US]; FARLEY JO) 7 August 2003 (2003-08-07) cited in the application the whole document -----	9-14, 25-36
Y	WO 2004/048404 A2 (CHIRON SRL [IT]; COMANDUCCI MAURIZIO [IT]; PIZZA MARIAGRAZIA [IT]) 10 June 2004 (2004-06-10) the whole document -----	9-14, 25-36
Y	JIANG H Q ET AL: "Broad vaccine coverage predicted for a bivalent recombinant factor H binding protein based vaccine to prevent serogroup B meningococcal disease", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 28, no. 37, 23 August 2010 (2010-08-23), pages 6086-6093, XP027204839, ISSN: 0264-410X [retrieved on 2010-07-07] the whole document -----	9-14, 25-36

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2013/051791

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009104097 A2	27-08-2009	AU 2009215364 A1	27-08-2009
		CA 2716212 A1	27-08-2009
		CN 102356089 A	15-02-2012
		EP 2245048 A2	03-11-2010
		NZ 587382 A	12-01-2012
		NZ 596805 A	28-06-2013
		RU 2010138815 A	27-03-2012
		US 2011020390 A1	27-01-2011
		US 2013115238 A1	09-05-2013
		WO 2009104097 A2	27-08-2009
WO 2011024072 A2	03-03-2011	AU 2010288240 A1	22-03-2012
		CA 2772104 A1	03-03-2011
		CN 102596240 A	18-07-2012
		EP 2470204 A2	04-07-2012
		JP 2013502918 A	31-01-2013
		US 2011076300 A1	31-03-2011
		WO 2011024072 A2	03-03-2011
WO 2012032489 A1	15-03-2012	AR 082952 A1	23-01-2013
		AU 2011300409 A1	07-03-2013
		CA 2809758 A1	15-03-2012
		CN 103096920 A	08-05-2013
		CO 6690760 A2	17-06-2013
		EP 2613806 A1	17-07-2013
		KR 20130079536 A	10-07-2013
		SG 187912 A1	30-04-2013
		TW 201223542 A	16-06-2012
		US 2012093852 A1	19-04-2012
		WO 2012032489 A1	15-03-2012
WO 03063766 A2	07-08-2003	AU 2009213040 A1	08-10-2009
		BR 0212999 A	23-05-2006
		CA 2463476 A1	07-08-2003
		CN 1578785 A	09-02-2005
		CN 102755631 A	31-10-2012
		CN 102836426 A	26-12-2012
		EP 1442047 A2	04-08-2004
		EP 2332961 A2	15-06-2011
		EP 2341062 A2	06-07-2011
		EP 2341063 A2	06-07-2011
		EP 2343308 A2	13-07-2011
		EP 2348034 A2	27-07-2011
		EP 2348035 A2	27-07-2011
		EP 2348036 A2	27-07-2011
		EP 2351767 A2	03-08-2011
		EP 2366707 A1	21-09-2011
		EP 2371836 A1	05-10-2011
		EP 2371837 A1	05-10-2011
		EP 2371838 A1	05-10-2011
		JP 2005515771 A	02-06-2005
		JP 2010162023 A	29-07-2010
		KR 20100028657 A	12-03-2010
		KR 20100121699 A	18-11-2010
		KR 20110117726 A	27-10-2011
		MX PA04003356 A	29-11-2004
		US 2006257413 A1	16-11-2006
		US 2011076299 A1	31-03-2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2013/051791

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2012034261 A1	09-02-2012
		US 2012201844 A1	09-08-2012
		US 2012294880 A1	22-11-2012
		US 2012301496 A1	29-11-2012
		US 2012308595 A1	06-12-2012
		US 2013259889 A1	03-10-2013
		WO 03063766 A2	07-08-2003
WO 2004048404 A2	10-06-2004	AU 2003288681 A1	18-06-2004
		BR 0316501 A	04-10-2005
		CA 2507009 A1	10-06-2004
		CN 1732183 A	08-02-2006
		EP 1562983 A2	17-08-2005
		EP 2258716 A2	08-12-2010
		EP 2258717 A2	08-12-2010
		EP 2261239 A2	15-12-2010
		HK 1088342 A1	27-03-2009
		JP 4767540 B2	07-09-2011
		JP 2006521782 A	28-09-2006
		JP 2010162038 A	29-07-2010
		MX PA05005442 A	26-08-2005
		NZ 540206 A	22-12-2006
		RU 2336091 C2	20-10-2008
		US 2006251670 A1	09-11-2006
		US 2012148617 A1	14-06-2012
		US 2012148618 A1	14-06-2012
		WO 2004048404 A2	10-06-2004

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-7, 17, 18, 46-51(completely); 8-16, 19-45(partially)

A variant of the 2086 lipoprotein from Neisseria meningitidis being a polypeptide comprising an amino acid sequence at least 95% identical to SEQ ID NO: 71, immunogenic compositions comprising said polypeptide, nucleic acids encoding said polypeptide, methods of inducing an immune response or methods of eliciting a bactericidal antibody using said immunogenic composition, said variant being preferably A62

2-12. claims: 8-16, 19-45(all partially)

Immunogenic compositions comprising a variant of the 2086 lipoprotein from Neisseria meningitidis serogroup B, methods of inducing an immune response or methods of eliciting a bactericidal antibody using said immunogenic composition, wherein for inventions 2-12, the variant is: A5, A12, A22, B01, B03, B09, B15, B16, B22, B24 or B44, respectively.

CAPÍTULO REIVINDICATORIO
(Solicitud de Divisional A)

1. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que es la SEQ ID NO: 76 o a la SEQ ID NO: 77.

2. El polipéptido aislado de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el polipéptido es lipidado.

3. El polipéptido aislado de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el polipéptido es no lipidado.

4. El polipéptido aislado de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el polipéptido es inmunogénico.

5. Un polipéptido aislado no lipidado y no piruvilado que comprende una secuencia de aminoácidos que es la SEQ ID NO: 55 o a la SEQ ID NO: 77, en donde los primeros veinte residuos de amino ácidos de la secuencia no comprenden una cisteína.

6. El polipéptido de acuerdo con la Reivindicación 5, en donde la secuencia de aminoácidos comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 55.

7. El polipéptido de acuerdo con la Reivindicación 5, en donde la secuencia de aminoácidos comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 77.

8. El polipéptido de acuerdo con la Reivindicación 5, en donde dicho polipéptido no exhibe un cambio de masas de aproximadamente +70 Da comparada con el polipéptido correspondiente no lipidado cuando se mide por medio de espectrometría de masas.

9. Un polipéptido aislado que consiste de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 55.

10. Un polipéptido aislado que consiste de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 76.

11. Un polipéptido aislado que consiste de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 77.

12. Una composición inmunogénica que comprende el polipéptido de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 11.

13. La composición de la Reivindicación 12, que además comprende un adyuvante.

****