



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112012024348-9 B1



(22) Data do Depósito: 29/03/2011

(45) Data de Concessão: 08/11/2022

(54) Título: COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, SEU USO, PROTEÍNA DE LIGAÇÃO AO FATOR H DE OCORRÊNCIA NÃO NATURAL, E CÉLULA BACTERIANA GENETICAMENTE MODIFICADA

(51) Int.Cl.: C07K 14/00; A61K 39/00.

(30) Prioridade Unionista: 07/02/2011 US 61/440,227; 08/09/2010 US 61/381,025; 13/05/2010 US 61/334,542; 16/12/2010 US 61/423,757; 30/03/2010 US 61/319,181.

(73) Titular(es): CHILDREN'S HOSPITAL & RESEARCH CENTER AT OAKLAND.

(72) Inventor(es): PETER T. BEERNINK; DAN M. GRANOFF; ROLANDO PAJON FEYT.

(86) Pedido PCT: PCT US2011030400 de 29/03/2011

(87) Publicação PCT: WO 2011/126863 de 13/10/2011

(85) Data do Início da Fase Nacional: 25/09/2012

(57) Resumo: "PROTEÍNA LIGADORA DO FATOR H DE OCORRÊNCIA NATURAL, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, ÁCIDO NUCLEICO, VETOR DE EXPRESSÃO RECOMBINANTE, CÉLULA HOSPEDEIRA GENETICAMENTE MODIFICADA, MÉTODOS DE DETERMINAR PROBABILIDADES DE ELICITAR ANTICORPOS BACTERICIDAS E PARA PRODUÇÃO DE CÉLULA MODIFICADA E USO DA REFERIDA PROTEÍNA OU COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA". A presente invenção refere-se a proteínas ligadoras de fator H que podem elicitar anticorpos que são bactericidas para pelo menos uma cepa de N. meningitidis, e métodos de uso de tais proteínas, que são fornecidos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para “**COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, SEU USO, PROTEÍNA DE LIGAÇÃO AO FATOR H DE OCORRÊNCIA NÃO NATURAL, E CÉLULA BACTERIANA GENETICAMENTE MODIFICADA**”.

REFERÊNCIA CRUZADA

[0001] Este pedido de patente reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisório US 61/319.181, depositado em 30 de março de 2010, 61/334.542, depositado em 13 de maio de 2010, 61/381.025, depositado em 8 de setembro de 2010, 61/423.757, depositado em 16 de dezembro de 2010, e 61/440.227, depositado em 7 de fevereiro de 2011, cada um destes pedidos de patente é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

DECLARAÇÃO RELATIVA À PESQUISA DE PATROCÍNIO FEDERAL

[0002] Esta invenção foi feita com o apoio do governo sob os números de concessão R01 AI 046464, R01 AI 082263, e AI 070955 concedidas pelo National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health. O governo tem certos direitos nesta invenção.

INTRODUÇÃO

[0003] *Neisseria meningitidis* é uma bactéria Gram-negativa que coloniza o trato respiratório superior humano e é responsável por erupções epidêmicas esporádicas e cíclicas mundiais de, mais particularmente, meningite e sepse. As taxas de ataque e morbidez são mais altas em crianças abaixo de 2 anos de idade. Como outras bactérias Gram-negativas, *Neisseria meningitidis* tipicamente possui uma membrana citoplásmica, uma camada de peptidoglicano, uma membrana externa que junto com o polissacarídeo capsular constituem a parede bacteriana, e *pili* que se projetam para dentro do ambiente externo. Cepas encapsuladas de *Neisseria meningitidis* são uma causa principal de meningite bacteriana e septicemia em crianças e adultos jo-

vens. A prevalência e a importância econômica das infecções de *Neisseria meningitidis* invasivas dirigiram a pesquisa para vacinas efetivas que possam conferir imunidade ao longo de diferentes cepas, e particularmente ao longo de cepas do grupo B geneticamente diversas com diferentes sorotipos ou sorosubtipos.

[0004] Proteína de ligação ao fator H (fHbp, também referida na técnica como lipoproteína 2086 (Fletcher et al (2004) *Infect Immun* 72:2088-2100), Genome-derived Neisserial antigen (GNA) 1870 (Massignani et al. (2003) *J Exp Med* 197:789-99) ou "741") é uma proteína de *N. meningitidis* que é expressa na bactéria como uma lipoproteína exposta à superfície. Uma função importante de fHbp é ligar o fator de complemento humano H (fH), que infraregula a ativação do complemento. Ligação do fH à superfície bacteriana é um mecanismo importante pelo qual o patógeno sobrevive em soro humano não-imune ou sangue e evade as defesas inatas do hospedeiro. Recentemente, variação genética no agrupamento gênico do fator humano H foi constatada afetar a suscetibilidade da doença meningocócica em desenvolvimento (Davila S et al. (2010) *Nat Genetics* doi:10.1038/ng.640). Ligação de fH à fHbp é específica para fH humano e poderia esclarecer por que *Neisseria meningitidis* é estritamente um patógeno humano.

[0005] Resta uma necessidade por um polipeptídeo de fHbp que possa suscitar respostas efetivas de anticorpos bactericidas.

SUMÁRIO

[0006] Proteínas de ligação ao fator H que podem suscitar anticorpos que são bactericidas para pelo menos uma cepa de *N. meningitidis*, e métodos de uso de tais proteínas, são fornecidos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0007] Figura 1. Painel A, curva padrão de concentração de fH humano conforme medida por ELISA com fHbp meningocócica como o antígeno nos poços. Vide Exemplo 1 para detalhes. Painel B, concen-

trações de fH humano em soros de camundongos transgênicos de fH humano (Tg), que abrangem filhotes da mesma ninhada fH humano-negativos de camundongos Tg ou camundongos BALB/c do tipo selvagem conhecidos e concentrações de fH humano nos soros de humanos. Vide Exemplo 1.

[0008] Figura 2. Respostas de anticorpos de IgG sérica de camundongos BALB/c transgênicos de fH humano (Tg de fH) e camundongos BALB/c do tipo selvagem (WT) imunizados com uma vacina de controle conjugada do grupo C meningocócica (Painéis A e B), e titulações bactericidas séricas contra a cepa do grupo C 4243 (Painel C). A vacina conjugada não se liga ao fH humano. Vide Exemplo 1 para detalhes. Painel D. fH humano se liga à vacina de fHbp do tipo selvagem, mas não se liga à vacina conjugada de MenC-CRM de controle ou a certas vacinas de fHbp mutante, mostradas esquematicamente acompanhar a Tabela 5 na seção de exemplo. fH de camundongo (ou coelho, ou rato, etc.) não se liga à fHbp do tipo selvagem.

[0009] Figura 3. Relações entre as concentrações de fH humano em soro de camundongos transgênicos de fH e respostas de anticorpo bactericida em soro à vacinação com fHbp do tipo selvagem que se liga ao fH humano (painel A) ou à vacinação com mutante R41S que não se liga ao fH humano (painel B). Painel C mostra as razões de GMT (vacina mutante/tipo selvagem em relação às concentrações de fH humano em soro de camundongos transgênicos de fH imunizados) estimadas do modelo de regressão linear geral. Vide Exemplo 4 para detalhes.

[00010] Figura 4. Ligação de mAbs de fH humano, e de anti-fHbp, JAR 4, e JAR 5, através de fHbps do tipo selvagem e mutante (mutantes de fHbp ID 1 contendo substituições Glu a Ala) conforme medida por ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA).

[00011] Figura 5. Análise de tamanho e pureza por SDS-PAGE e de

fHbp ID 1 WT e um mutante duplo de ID 1, E218A/E239A. As massas moleculares em kDa estão indicadas à esquerda.

[00012] Figura 6. Inibição de fHbp solúvel de ligação de MAb de anti-fHbp à fHbp do tipo selvagem imobilizada por ELISA.

[00013] Figura 7. Painéis A e B descrevem calorimetria de varredura de diferencial de fHbp ID 1 do tipo selvagem e proteína mutante dupla E218A/E239A (painel A) e de fHbp ID 1 do tipo selvagem e proteína mutante R41S (painel B). Painel C descreve as titulações de anticorpo de IgG de anti-fHbp de camundongos imunizados com fHbp ID 1 do tipo selvagem ou proteína mutante dupla E218A/E239A determinadas por ELISA. Respostas de anticorpo de anti-fHbp de IgG de camundongos imunizados com fHbp WT ou mutante. No Estudo 3, os camundongos foram imunizados com três doses de fHbp WT ou mutante recombinante adsorvidas com o Adjuvante de Freund (FA) ou hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$); no Estudo 4, os camundongos de CD-1 foram imunizados com uma dose de fHbp WT ou mutante adsorvida com hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$); no Estudo 5, camundongos BALB/c foram imunizados com três doses de fHbp WT ou mutante adsorvidas com hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$). Barras cheias, fHbp WT; barras vazias, fHbp mutante de E218A/E239A. Painel D descreve titulações de IgG de anti-fHbp de camundongos BALB/c que receberam duas doses de vacina de fHbp no Estudo 6.

[00014] Figura 8. Painel A descreve a ligação de fH às variantes de fHbp naturais. Os poços das placas de microtitulação foram revestidos com fHbps recombinantes representando as variantes fHbp IDs 1, 14, ou 15. Ligação de fH humano foi medida como descrito na seção de Exemplos. Painéis B e C descrevem a ligação das variantes fHbp IDs 1, 14, e 15 a MAb JAR4 e JAR5, respectivamente.

[00015] Figura 9. Painel A, Estrutura do complexo entre fHbp e um fragmento de fH humano. fHbp é mostrada ao fundo em preto com fH

mostrado ao topo em cinza em representação desenhada. Modelo estrutural de fHbp ligado a um fragmento de fH com base nas coordenadas atômicas publicadas (Schneider et al. ((2009) *Nature* 458:890-3)). As tiras pretas representam os respectivos domínios N e C-terminais da molécula de fHbp. A tira cinza representa os sexto e sétimo domínios repetidos de consenso curtos repetidos de fH humano previamente mostrados para mediar a interação de fH humano e fHbp (Schneider et al. ((2009) *Nature* 458:890-3)). A vista ampliada na esquerda focaliza no resíduo de arginina na posição 41, mostrando uma ligação de H carregada com fH, que foi prognosticado ser eliminada quando a arginina foi substituída por serina (inserção inferior direita). A Figura foi gerada usando MacPyMol (www.pymol.org). Painel B mostra a sequência de aminoácidos de fator humano H (fH) que é também conhecida como acesso do GenBank no. NP_000177 (P08603), e seu ácido nucleico de codificação como NM_000186.

[00016] Figura 10. Ligação de MAb de fH (painel A) ou de anti-fHbp JAR 4 (painel B) ou JAR 5 (painel C) aos mutantes R41S e R41A de fHbp ID 1, conforme medida por ELISA. Ligação de MAb de fH humano (painel A), e de anti-fHbp (painéis B e C) foi medida como descrito no Exemplo 2.

[00017] Figura 11. Ligação de MAb de fator humano H (coluna esquerda) ou de anti-fHbp JAR 4 (coluna direita) às fHbps diferentes no grupo de variantes 1 e seus mutantes R41S correspondentes. Ligação foi medida como descrito no Exemplo 2. Painéis A e B mostram os resultados da ligação para fHbp ID 4. Painéis C e D mostram os resultados da ligação para fHbp ID 9. Painéis E e F mostram os resultados da ligação para fHbp ID 74. "ID" refere-se ao número de identificação (ID) de variante da sequência de aminoácidos de fHbp, como descrito no sítio da rede de *Neisseria* Multi Locus Sequence Typing [http://pubmlst\(dot\)org/Neisseria/fHbp/](http://pubmlst(dot)org/Neisseria/fHbp/).

[00018] Figura 12. Ligação de MAb de fH humano e de anti-fHbp de controle à fHbp e mutantes R41S correspondentes de fHbps no grupo de variantes 2. Painéis A e B mostram a ligação do fator humano H à fHbp do tipo selvagem (WT) ID 19 e mutante R41S de fHbp ID 19. Painéis C e D mostram a ligação do fator humano H à fHbp WT ID 22 e mutante R41S de fHbp ID 22. Painéis E e F mostram a ligação do fator humano H à fHbp WT ID 77 e mutante R41S de fHbp ID 77. Os controles de MAb eram JAR 4 (Painéis B e D) ou JAR 11 (Painel F).

[00019] Figura 13. Efeito do anticorpo de anti-fHbp em soro suscitado em camundongos transgênicos de fH humano na ligação de fH à fHbp. Ligação de fH à fHbp foi medida por ELISA em diluições 1:100 de soros de pré-imunização (painel A, pré-imune) e pós-imunização (painel B, pós-imune) de camundongos transgênicos individuais imunizados com vacinas de fHbp de fHbp ID 1 do tipo selvagem ou mutante de R41S. Para os grupos de controle de alumínio, os quadrados vazios representam os dados de fundo geral de soro de camundongos transgênicos cujos soros contêm fH humano e os triângulos cheios representam os dados de soros de camundongos do tipo selvagem cujos soros não contêm nenhum fH humano. Os valores de OD representam a quantidade de fH humano ligado como detectada com fH anti-humano de ovelha e IgG de antiovelha de burro conjugado com fosfatase alcalina. Painel C, titulações de anti-fHbp de IgG séricas de pós-imunização mostrando respostas de anticorpo similares a ambas as vacinas. Painel D, Inibição da ligação de fH humano à fHbp na presença de fH humano adicionado. Painel E, Relação da porcentagem de inibição da ligação de fH e titulações de SBA de camundongos transgênicos de fH humano imunizados com vacinas de fHbp.

[00020] Figura 14. Ligação de fH com um mutante K241E de fHbp ID 1 e sua ligação a MAb JAR 5 são mostradas nos painéis A e B, respectivamente. Ligação de fH com um mutante E241K de fHbp ID 15 e

sua ligação a MAb JAR 5 são mostradas nos painéis C e D, respectivamente. Ligação de MAb de fH ou de anti-fHbp à fHbp foi medida como descrito no Exemplo 2.

[00021] Figura 15. Ligação de MAbs de fH ou de anti-fHbp aos mutantes simples H119A e R130A de fHbp ID 1, conforme medida por ELISA. Ligação de fH humano (painel A), e MAbs de anti-fHbp JAR 5 (painel B), ou JAR 4 (painel C) foi medida como descrito no Exemplo 2.

[00022] Figura 16. Representação esquemática dos seis grupos modulares de fHbp mais comuns, designados I a VI. Os segmentos variáveis são cada derivados de uma das duas linhagens genéticas, designadas α (mostrada em cinza) ou β (branco). As linhagens α e β podem ser também designadas como linhagens 1 e 2, respectivamente, de acordo com a nomenclatura adotada pelo sítio de rede pubmlst.org/Neisseria/fHbp/. Segmento V_A começou no resíduo de aminoácido 8 e estendeu-se para a posição 73 enquanto o segmento V_B começou na posição 79 e estendeu-se para posição 93 (numeração do resíduo de aminoácido com base na sequência de fHbp ID 1). Segmento V_C começou no resíduo de aminoácido 98 e estendeu-se para a posição 159 enquanto o segmento V_D começou na posição 161 e estendeu-se para a posição 180. Segmento V_E começou no resíduo de aminoácido 186 e estendeu-se para a posição 253. Das 70 variantes de sequência de aminoácidos de fHbp analisadas, 33 continham apenas segmentos do tipo α , e 7 continham apenas segmentos do tipo β , que foram designadas como grupos modulares I e II, respectivamente. As 30 variantes de fHbp restantes eram quimeras naturais com combinações diferentes dos segmentos α e β e poderiam ser atribuídas a um dos quatro grupos modulares (III-VI). A relação entre a designação da variante do grupo modular e do grupo de Massignani, e o número de sequências únicas observadas dentro de cada grupo modular de fHbp, é mostrada. A arquitetura modular das quimeras de fHbp engenhaira-

das I (de ocorrência não-natural) é mostrada como o último esquemático modular na Figura 16. Para uma proteína quimérica engenheirada de fHbp ID 1 e ID 77 "quimera I" (Beernink et al. (2008) *Infec. Immun.* 76:2568-2575), quatro resíduos de aminoácido, GEHT (SEQ ID NO: 27) na posição 136 a 139 representam o ponto de junção no segmento V_C (vide Figura 19). ID refere-se ao número de identificação do peptídeo da sequência de fHbp como descrito no sítio de rede público, <http://pubmlst.org/Neisseria/fHbp/>.

[00023] Figura 17. Ligação de fH com mutante S41P de fHbp recombinante (mutante de fHbp ID 15). Ligação de fH com um mutante S41P de fHbp ID 15 é mostrada no Painel A. Ligação do mutante S41P de fHbp ID 15 a MAb JAR 5 e a MAb JAR31 é mostrada nos painéis B e C, respectivamente. "Pep28" é fHbp ID 28; "Pep1" é fHbp ID 1; "Pep 15 WT" é fHbp ID 15; e "S41P de Pep 15" é o mutante S41P de fHbp ID 15.

[00024] Figura 18. Ligação de fH humano ao mutante R41S da quimera I de fHbp (Beernink et al. (2008) *Infec. Immun.* 76:2568-2575) (painel A) e ligação correspondente de JAR 5 (Painel B).

[00025] Figura 19. Painel A, Alinhamento das sequências de fHbp de variantes naturais e uma quimera artificial (quimera I; Beernink et al. (2008) *Infec. Immun.* 76:2568-2575). fHbp ID 1 está no grupo modular I (todos os cinco segmentos variáveis, A-E, são derivados das linhagens α como definidas por Beernink e Granoff (2009) *Microbiology* 155:2873-83). fHbp ID 28 está no grupo modular II (todos os cinco segmentos são derivados das linhagens β). fHbp ID 15 é uma quimera natural (grupo modular IV com um segmento A de β e segmentos B, C, D e E de α). O segmento A do tipo β (V_A ; resíduos 8-73) de fHbp ID 28 é mostrado para comparação com o segmento A correspondente (V_A) de fHbp ID 15 que também tem um segmento A do tipo β ($V_{A\beta}$). Os resíduos alterados na fHbp de mutante duplo de E218A/E239A são

mostrados em retângulos. Painel B, Alinhamento do segmento A (resíduos de aminoácido 8 a 73) de fHbp ID 1 e fHbp ID 77. Painel C, Alinhamento do segmento C (resíduo de aminoácidos 98-159) de fHbp ID 1 e fHbp ID 77. O ponto de junção está no resíduo 136. FHbp quimérica inclui as sequências de aminoácidos de ID1 até o resíduo G136, e a sequência de fHbp ID 77 do resíduo 136 ao término C. Painel D, Alinhamento que mostra polimorfismos naturais na posição de aminoácido 41 (número de acordo com o de fHbp ID 1); algumas variantes têm arginina (R41, ID 1, 19, 4, 9 e 74) enquanto outras variantes têm serina (S41, ID 55, 15) ou prolina (P41, ID 28). ID refere-se à sequência de fHbp ID; MG refere-se ao grupo modular de fHbp; e VG refere-se ao grupo variante. Painel E, Alinhamento de fHbp ID 1, fHbp ID 77 e quimera I. Resíduos sombreados em fHbp ID 77 destacam os resíduos no segmento V_C que são diferentes das posições correspondentes na quimera I. Resíduos em negrito e sombreados correspondem a K113, K119, e D121, na ordem do término N para o término C.

[00026] Figura 20. Ligação de fH ou um MAb de anti-fHbp aos mutantes simples K113A, K119A, e D121A de fHbp ID 77, conforme medida por ELISA. Ligação de fH humano (painel A), e MAb de anti-fHbp JAR 31 (painel B) foi medida como descrito no Exemplo 2.

[00027] Figura 21. Ligação de fH ou um MAb de anti-fHbp para R41S/K113A, R41S/K119A, e R41S/D121A mutantes dupla de fHbp ID 77, conforme medido por ELISA. Ligação de fH humano (painel A), e MAb de anti-fHbp JAR 31 (painel B) estava medido como descrito no Exemplo 2.

[00028] Figura 22. Ligação de fH ou um MAb de anti-fHbp ao mutante duplo K113A/D121A e mutante triplo R41S/K113A/D121A de fHbp ID 77, conforme medida por ELISA. Ligação de fH humano (painel A), MAb de anti-fHbp JAR 4 (painel B), e MAb de anti-fHbp JAR 31 (painel C) foi medida como descrito no Exemplo 2.

[00029] Figura 23. Ligação de fH aos mutantes de fHbp ID 22, conforme medida por ELISA. Ligação de fH humano a D211A, R80A, ou fHbp do tipo selvagem (painel A), a E218A, E248A, ou fHbp do tipo selvagem (painel B), e a R41S, Q38A, Q126A, ou fHbp do tipo selvagem (painel C) foi medida como descrito no Exemplo 2.

[00030] Figura 24. Ligação de MAb de anti-fHbp JAR31 aos mutantes de fHbp ID 22, conforme medida por ELISA. Ligação dos mutantes R80A e D211A (painel A), e ligação dos mutantes E218A e E248A (painel B) a JAR31 foi medida como descrito no Exemplo 2.

[00031] Figura 25. Ligação de MAb de anti-fHbp JAR4 aos mutantes de fHbp ID 22, conforme medida por ELISA. Ligação dos mutantes R80A e D211A (painel A), e ligação dos mutantes E218A e E248A (painel B) JAR 4 foi medida como descrito no Exemplo 2.

[00032] Figura 26. Ligação de MAb de anti-fHbp JAR35 aos mutantes de fHbp ID 22, conforme medida por ELISA. Ligação dos mutantes R80A e D211A (painel A), e ligação dos mutantes E218A e E248A (painel B) a JAR35 foi medida como descrito no Exemplo 2.

[00033] Figura 27. Ligação de MAb de fH ou de anti-fHbp a um mutante duplo T220A/H22A, ou um mutante G236I, de fHbp ID 22, conforme medida por ELISA. Ligação de fH humano (painel A), e MAb de anti-fHbp JAR 31 (painel B), JAR 35 (painel C), ou JAR 4 (painel D), foi medida como descrito no Exemplo 2.

[00034] Figura 28. Ligação de MAb de fH ou de anti-fHbp aos mutantes R41S, Q38A, e A235G de fHbp ID 22, conforme medida por ELISA. Ligação de fH humano (painel A), e MAb de anti-fHbp JAR 31 (painel B), ou JAR 35 (painel C), foi medida como descrito no Exemplo 2.

[00035] Figura 29. Ligação de fH ou um MAb de anti-fHbp aos mutantes Q126A, D201A, e E202A de fHbp ID 22, conforme medido por ELISA. Ligação de fH humano (painel A), e MAb de anti-fHbp JAR 35 (painel B) foi medida como descrito no Exemplo 2.

[00036] Figura 30. Ligação aos mutantes de fHbp ID 28 (grupo de variantes 3). Painéis A e C. Ligação de fH as mutantes K199A, E217A, e E218A conforme medida por ELISA. Painéis B e D. Ligação de MAb de anti-fHbp JAR 31 (painel B), e MAb de anti-fHbp JAR 33 (painel D, tipo selvagem de fHbp ID 28 WT e mutante E218A apenas) é mostrada.

[00037] Figura 31 descreve titulações bactericidas séricas de camundongos BALB/c do tipo selvagem imunizados com os mutantes indicados de vacina de fHbp ID 1 e medidas contra cepa do grupo B H44/76 (fHbp ID 1).

[00038] Figura 32 descreve titulações bactericidas séricas de camundongos imunizados com os mutantes indicados de fHbp ID 22 conforme medidas contra cepa do grupo W-135 Ghana 7/04 (fHbp ID 23). Painel superior, vacinas mutantes com titulações que não eram significativamente diferentes que a vacina de fHbp ID 22 do tipo selvagem (WT) ($P > 0,10$). Painel inferior, vacinas mutantes que suscitam titulações significativamente mais baixas que a vacina de WT ID 22 de controle ($P < 0,05$).

[00039] Figura 33 descreve titulações bactericidas de camundongos imunizados com um mutante triplo R41S/K113A/D121A de fHbp ID 77 conforme medidas contra cepa do grupo W-135 Ghana 7/04 (fHbp ID 23).

[00040] Figura 34. Alinhamento das sequências de aminoácidos de fHbp ID 1 (SEQ ID NO: 1), fHbp ID 22 (SEQ ID NO: 2), fHbp ID 77 (SEQ ID NO: 4), fHbp ID 28 (SEQ ID NO: 3), e quimera de ID1/ID77 (SEQ ID NO: 8). ID 28 é mostrado como uma sequência de referência para o grupo de variantes 3 de fHbp. Resíduos preditivos da interface de ligação do fator H com ligação de hidrogênio ou interações iônicas (realçadas em cinza) de uma estrutura de cristal de fHbp ID 1 em um complexo com um fragmento de fH, como descrito em Schneider et al. ((2009) *Nature* 458:890-3). GEHT (SEQ ID NO: 27) (em negrito) na

posição 136 a 139 representa o ponto de junção entre ID 1 e ID 77 para a fHbp quimérica.

[00041] Figura 35. Alinhamento das sequências de aminoácidos de fHbp ID 1 (SEQ ID NO: 1), fHbp ID 22 (SEQ ID NO: 2), fHbp ID 77 (SEQ ID NO: 4), fHbp ID 28 (SEQ ID NO: 3), e quimera de ID1/ID77 (SEQ ID NO: 8). Resíduos realçados em cinza indicam resíduos mutados e resumidos na Tabela 7.

[00042] Figura 36 descreve um modelo de fHbp em um complexo com um fragmento de fH. As posições dos resíduos de aminoácido conhecidas afetar os epítomos de mAb de anti-fHbp JAR 3 e JAR 5 (G121 e K122) e mAb 502 (R204) são descritas.

[00043] Figuras 37A-D descrevem a ligação de mAbs fHbp-específicos quiméricos de camundongo de IgGa humana conforme medida por ELISA (Painel A), ressonância de plasmon (Painel B) ou bactérias vivas através de citometria de fluxo (Painel C, mAbs sozinhos; e Painel D, mAbs na presença de 20% de soro humano depletado de IgG).

[00044] Figuras 38A-B descrevem a deposição de C4b C1q-dependente a partir da ativação de complemento em bactérias encapsuladas do grupo B da cepa H44/76 por mAbs de anti-fHbp quimérica de camundongo de IgG1 humana JAR 3, JAR 5 e mAb 502. Painel A, soro humano depletado de C1q como fonte de complemento; Painel B, soro depletado de C1q que tinha sido repleto com proteína de C1q purificada antes das reações. Painel C descreve a atividade bactericida mediada por complemento humano dos respectivos mAbs conforme medida contra a cepa do grupo B H44/76.

[00045] Figuras 39A-C descrevem a inibição da ligação de fH através dos mAbs de anti-fHbp conforme medida por ELISA com fHbp aderido aos poços da placa de microtitulação (Painel A), e com as bactérias vivas da cepa do grupo B H44/76 conforme medida por citome-

tria de fluxo (Painéis B e C).

[00046] Figuras 40A-C descrevem a ligação de fH a mutantes do grupo B H44/76 com inativação genética da expressão de fHbp, ou fHbp e NspA. Painel A, ligação de um mAb de anti-PorA de controle; Painéis B e C, ligação de fH em soro humano depletado de IgG.

[00047] Figuras 41A-E descrevem a atividade bactericida dos mAbs de anti-fHbp quimérica de camundongo de IgG humana medida contra um mutante do grupo B H44/76 com inativação genética de NspA. Painéis A, B, e C: mAbs de anti-fHbp JAR 3, JAR 5 e mAb 502, respectivamente; Painéis D e E: mAbs de anti-PorA e anticapsular de controle, respectivamente.

[00048] Figura 42 descreve atividade bactericida contra uma cepa capsular do grupo A (Senegal 1/99) de um anticorpo de anti-NspA contra uma fHbp geneticamente silenciada de uma cepa do grupo A (painel do topo) ou mAb de anti-PorA de controle P1.9 (painel inferior).

[00049] Figura 43, Painéis A-C, descreve respostas de anticorpo de anti-fHbp em soro de camundongos do tipo selvagem imunizados com vacina de fHbp recombinante ou vacinas da vesícula de membrana externa nativa de mutantes da cepa do grupo B H44/76 com fHbp supraexpressa ou silenciamento genético de fHbp. Respostas de anticorpo de anti-fHbp à vacinação conforme medidas por ELISA (Painel A), ou a habilidade dos anticorpos de anti-fHbp em soro para inibir a ligação de fH à fHbp (Painéis B e C, também por ELISA). Os camundongos foram imunizados com vacina de fHbp ID 1 recombinante (triângulos cheios), ou vacinas de NOMV preparadas de mutantes da cepa do grupo B H44/76 com fHbp ID 1 supraexpressa (círculos vazios) ou um silenciamento genético de fHbp (círculos cheios).

[00050] Figura 44 apresenta uma sequência de aminoácidos de um polipeptídeo da proteína A de superfície de *Neisseria* (NspA) (SEQ ID NO: 15).

[00051] Figura 45. Sequências de aminoácidos de várias proteínas de ligação do fator H de ocorrência natural (fHbps): fHbp ID 1, fHbp ID 15, fHbp ID 22, fHbp ID 28, fHbp ID 77, e quimera I (Beernink et al. (2008) *Infec. Immun.* 76:2568-2575). Sequências de FHbp ID são mostradas sem uma sequência líder. Na sequência mostrada para a quimera I, as letras minúsculas correspondem à sequência de aminoácidos que é derivada de fHbp ID 1 enquanto as letras maiúsculas correspondem ao aminoácido que é derivado de ID 77.

[00052] Antes da presente invenção e das modalidades exemplares específicas da invenção serem descritas, é para ser entendido que esta invenção não é limitada às modalidades particulares descritas, visto que tais podem, naturalmente, variar. É para ser entendido também que a terminologia aqui usada é para o propósito de descrever as modalidades particulares apenas, e não é intencionada ser limitativa, uma vez que o escopo da presente invenção será limitado apenas pelas reivindicações em anexo.

[00053] Onde uma faixa de valores for fornecida, é entendido que cada valor interveniente, à décima da unidade do limite inferior a menos que o contexto dite claramente do contrário, entre o limite superior e inferior daquela faixa e qualquer outro valor declarada ou interveniente naquela faixa declarada é abrangido dentro da invenção. Os limites superior e inferior destas faixas menores que podem ser independentemente incluídos nas faixas menores são também abrangidos dentro da invenção, sujeito a qualquer limite especificamente excluído da faixa declarada. Onde a faixa declarada incluir um ou ambos os limites, faixas excluindo qualquer um de ambos daqueles limites incluídos são também inclusas na invenção.

[00054] É apreciado que certas características da invenção, que são, para clareza, descritas no contexto de modalidades separadas, podem também ser fornecidas em combinação em uma modalidade

só. Inversamente, várias características da invenção, que são, para brevidade, descritas no contexto de uma modalidade só, podem também ser fornecidas separadamente ou em qualquer subcombinação adequada. Todas as combinações das modalidades que pertencem às modificações de aminoácido, incluindo substituições de aminoácido, com relação a uma sequência de aminoácidos de referência são especificamente abrangidas pela presente invenção e são reveladas aqui da mesma maneira que se cada e toda combinação fosse individual e explicitamente revelada, na proporção que tais combinações abranjam polipeptídeos tendo características desejadas, por exemplo, polipeptídeos de fHbp de ocorrência não natural tendo uma afinidade inferior por um fH humano que a de fHbp ID 1. Além disso, todas as subcombinações de tais modificações de aminoácido (incluindo substituições de aminoácido) listadas nas modalidades que descrevem tais modificações de aminoácido são também especificamente abrangidas pela presente invenção e são reveladas aqui da mesma maneira que se cada e toda tal subcombinação de tais modificações de aminoácido fosse individual e explicitamente revelada aqui.

[00055] A menos que do contrário definido, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm o mesmo significado que comumente entendido por alguém de habilidade usual na técnica ao qual esta invenção pertence. Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui possam também ser usados na prática ou teste da presente invenção, os métodos e materiais preferidos são agora descritos. Todas as publicações mencionadas aqui são aqui incorporadas por referência para revelar e descrever os métodos e/ou materiais com relação aos quais as publicações são citadas.

[00056] Deve ser observado que, como aqui usado e nas reivindicações em anexo, as formas singulares "um(a)" e "o/a" incluem referentes plurais a menos que o contexto dite claramente do contrário.

Desse modo, por exemplo, referência a "um antígeno" inclui uma pluralidade de tais antígenos e referência à "proteína" inclui referência a uma ou mais proteínas, e assim sucessivamente.

[00057] As publicações debatidas aqui são providas unicamente para sua revelação antes da data de arquivamento do presente pedido de patente. Nada aqui é para ser interpretado como uma admissão que a presente invenção não é intitulada para antecipar tal publicação em virtude da invenção anterior. Ainda, as datas de publicação fornecidas podem ser diferentes das datas de publicação atuais que podem necessitar ser independentemente confirmadas.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[00058] Proteínas de ligação ao fator H que podem suscitar anticorpos que são bactericidas para pelo menos uma cepa de *N. meningitidis*, e métodos de usar tais proteínas, são fornecidas.

DEFINIÇÕES

[00059] "Proteína de ligação ao fator H" (fHbp) que é também conhecida na literatura como GNA1870, GNA 1870, ORF2086, LP2086 (lipoproteína 2086), e "741" refere-se a uma classe de polipeptídeos de *N. meningitidis*. É encontrada na natureza como uma lipoproteína na superfície das cepas da bactéria *N. meningitidis*. fHbps foram subdivididas em três grupos de variantes de fHbp (referidas como variante 1 (v.1), variante 2 (v.2), e variante 3 (v.3) em alguns relatórios (Masignani et al. (2003) *J Exp Med* 197:789-99) e Família A e B em outros relatórios (vide, por exemplo, Fletcher et al. (2004) *Infect Immun* 72:2088-2100)) com base na variabilidade da sequência de aminoácidos e reatividade cruzada imunológica (Masignani et al. (2003) *J Exp Med* 197:789-99). Cada fHbp única encontrada em *N. meningitidis* é também atribuída a um peptídeo de fHbp ID de acordo com o sítio de rede *Neisseria.org* ou *pubmlst.org/Neisseria/fHbp/*. Porque o comprimento da proteína de fHbp de variante 2 (v.2) (da cepa 8047, fHbp ID 77) e

fHbp de variante 3 (v.3) (da cepa M1239, fHbp ID 28) diferem em -1 e +7 resíduos de aminoácido, respectivamente, daquela de MC58 (fHbp ID 1), a numeração usada para referir aos resíduos para as proteínas de fHbp de v.2 e v.3 diferem da numeração com base nas sequências de aminoácidos atuais destas proteínas. Desse modo, por exemplo, referência a um resíduo de leucina (L) na posição 166 da sequência de fHbp de v.2 e v.3 refere-se ao resíduo na posição 165 da proteína de v.2 e na posição 173 na proteína de v.3.

[00060] Fator humano H ("fH humano") como aqui usado, refere-se a uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácidos como mostrada na Figura 9B (SEQ ID NO: 9), e variantes alélicas humanas de ocorrência natural da mesma.

[00061] O termo "heterólogo" ou "quimérico" refere-se a dois componentes que são definidos por estruturas derivadas de fontes diferentes ou sequências de progenitor. Por exemplo, onde "heterólogo" for usado no contexto de um polipeptídeo quimérico, o polipeptídeo quimérico pode incluir sequências de aminoácidos operavelmente ligadas que podem ser derivadas de polipeptídeos diferentes de agrupamentos filogênicos diferentes (por exemplo, um primeiro componente de um α e um segundo componente de umas sequências de aminoácidos de progenitor β). Um polipeptídeo quimérico contendo dois ou mais segmentos definidos, cada um destes é de um progenitor diferente, pode ser de ocorrência natural ou artificial (de ocorrência não natural). Vide Beernink PT, Granoff DM (2009) *Microbiology* 155:2873-83 para mais detalhe sobre quimeras de ocorrência natural. Quimeras de ocorrência não natural referem-se às "quimeras artificiais" e abrangem fHbp com componentes heterólogos que não são encontrados na natureza.

[00062] Um polipeptídeo "heterólogo" ou "quimérico" pode também conter dois ou mais componentes diferentes, cada derivado de uma fHbp diferente (por exemplo, variante 1, 2, ou 3). O componente pode

ser operavelmente ligado em qualquer posição ao longo do comprimento do polipeptídeo de fHbp.

[00063] "Heterólogo" no contexto de um polinucleotídeo que codifica qualquer polipeptídeo quimérico como descrito acima pode incluir sequência de ácidos nucleicos operavelmente ligada que pode ser derivada de genes diferentes (por exemplo, um primeiro componente de um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de fHbp de v.1 e um segundo componente de um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de fHbp de v.2) ou sequências de aminoácidos de progenitor diferentes (α ou β).

[00064] Outro exemplar "heterólogo" ácidos nucleicos incluem construções de expressão em que um ácido nucleico que compreende uma sequência de codificação é operavelmente ligado a um elemento regulador (por exemplo, um promotor) aquele é de uma origem genética diferente de que da sequência de codificação (por exemplo, prover para expressão em uma célula hospedeira de interesse que pode ser de origem genética diferente com relação para o promotor, a sequência de codificação ou ambos). Por exemplo, um promotor de T7 operavelmente ligado a um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de fHbp ou domínio dos mesmos é dito que é um ácido nucleico heterólogo.

[00065] "Heterólogo" no contexto de células recombinantes pode referir-se à presença de um ácido nucleico (ou produto gênico, tal como um polipeptídeo) que seja de uma origem genética diferente que a célula hospedeira na qual está presente. Por exemplo, um aminoácido de *Neisseria* ou sequência de ácidos nucleicos de uma cepa é heteróloga a um hospedeiro de *Neisseria* de outra cepa.

[00066] "Derivado de" no contexto de uma sequência de aminoácidos ou sequência de polinucleotídeos (por exemplo, uma sequência de aminoácidos "derivada de" fHbp ID 1) é significado indicar que o polipeptídeo ou ácido nucleico tem uma sequência que é com base na-

quela de um polipeptídeo ou ácido nucleico de referência (por exemplo, uma proteína de fHbp de ocorrência natural ou ácido nucleico de codificação), e não é significado ser limitativo quanto à fonte ou método em que a proteína ou ácido nucleico é feito. Exemplos não limitativos de polipeptídeos de referência e polinucleotídeos de referência dos quais uma sequência de aminoácidos ou sequência de polinucleotídeos pode ser "derivada" incluem uma fHbp de ocorrência natural, fHbp ID 1, e uma fHbp de ocorrência não-natural. "Derivado de" no contexto de cepas bacterianas é significado indicar que uma cepa foi obtida através de passagem *in vivo*, ou em cultura *in vitro*, de uma cepa parental e/ou é uma célula recombinante obtida por modificação de uma cepa parental.

[00067] "Substituição de aminoácido conservadora" refere-se a uma substituição de um resíduo de aminoácido por outro compartilhando as propriedades químicas e físicas da cadeia lateral de aminoácido (por exemplo, carga, tamanho, hidrofobicidade/hidrofilicidade). "Substituições conservadoras" são intencionadas incluir substituição dentro dos seguintes grupos de resíduos de aminoácido: gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; e phe, tyr. Orientação para tais substituições pode ser tirada de alinhamentos de sequências de aminoácidos de polipeptídeos apresentando o epítipo de interesse.

[00068] O termo "imunidade protetora" significa que um esquema de vacina ou de imunização que é administrado a um mamífero induz uma resposta imune que impede, retarda o desenvolvimento, ou reduz a severidade de uma doença que é causada por *Neisseria meningitidis*, ou diminui ou completamente elimina os sintomas da doença. Imunidade protetora pode ser acompanhada por produção de anticorpos bactericidas. Deveria ser observado que a produção de anticorpos bactericidas contra *Neisseria meningitidis* é aceita no campo como preditivo do efeito protetor de uma vacina em seres humanos. (Gold-

schneider et al. (1969) *J. Exp. Med.* 129:1307; Borrow et al. (2001) *Infect Immun.* 69:1568).

[00069] A frase "uma doença causada por uma cepa de *Neisseria meningitidis*" abrange qualquer sintoma clínico ou combinação de sintomas clínicos que estão presentes em uma infecção de um humano com um *Neisseria meningitidis*. Estes sintomas incluem, mas não são limitados a: colonização do trato respiratório superior (por exemplo, mucosa da nasofaringe e amígdalas) por uma cepa patogênica de *Neisseria meningitidis*, penetração das bactérias na mucosa e no leito vascular submucosal, septicemia, choque séptico, inflamação, lesões cutâneas hemorrágicas, ativação de fibrinólise e de coagulação de sangue, disfunção de órgão tal como rim, pulmão, e insuficiência cardíaca, hemorragia ad-renal e infartação muscular, vazamento capilar, edema, isquemia de membro periférico, síndrome de angústia respiratória, pericardite e meningite.

[00070] As frases "especificamente liga a um anticorpo" ou "especificamente imunorreativo com", no contexto de um antígeno (por exemplo, um antígeno de polipeptídeo) referem-se a uma reação de ligação que é com base e/ou é probante da presença do antígeno em uma amostra que pode também incluir uma população heterogênea de outras moléculas. Desse modo, sob condições designadas, o anticorpo especificado ou anticorpos liga(m) a um antígeno ou antígenos particulares em uma amostra e não liga(m) em uma quantidade significativa às outras moléculas presentes na amostra. "Especificamente liga a um anticorpo" ou "especificamente imunorreativo com" no contexto de um epítipo de um antígeno (por exemplo, um epítipo de um polipeptídeo) referem-se a uma reação de ligação que é com base e/ou é probante da presença do epítipo em um antígeno (por exemplo, polipeptídeo) que pode também incluir uma população heterogênea de outros epítipos, como também uma população heterogênea de antígenos. Desse

modo, sob as condições designadas, o anticorpo ou anticorpos especificados ligam a um epítopo particular de um antígeno e não ligam em uma quantidade significativa a outros epítomos presentes no antígeno e/ou na amostra.

[00071] A frase "em uma quantidade suficiente para suscitar uma resposta imune" significa que há uma diferença detectável entre um indicador de resposta imune medida antes e após a administração de uma preparação de antígeno particular. Indicadores de resposta imune incluem, mas não são limitados a: titulação ou especificidade de anticorpo, como detectado por um ensaio tal como imunoensaio ligado a enzima (ELISA), ensaio bactericida, citometria de fluxo, imunoprecipitação, imunodifusão de Ouchterlony; ensaios de detecção de ligação, por exemplo, tingimento, western blot ou arranjos de antígeno; ensaios de citotoxicidade, etc.

[00072] Um "antígeno de superfície" é um antígeno que está presente em uma estrutura de superfície de *Neisseria meningitidis* (por exemplo, a membrana externa, cápsula, *pili*, etc.).

[00073] "Isolado" refere-se a uma entidade de interesse que está em um ambiente diferente daquele em que o composto pode ocorrer naturalmente. "Isolado" é significado incluir compostos que estão dentro das amostras que são substancialmente enriquecidas para o composto de interesse e/ou em que o composto de interesse é parcial ou substancialmente purificado.

[00074] "Enriquecida" significa que uma amostra é manipulada não-naturalmente (por exemplo, por especialista ou um clínico) de modo que um composto de interesse esteja presente em uma concentração maior (por exemplo, pelo menos três vezes mais, pelo menos 4 vezes mais, pelo menos 8 vezes mais, pelo menos 64 vezes mais, ou mais) que a concentração do composto na amostra inicial, tal como uma amostra biológica (por exemplo, uma amostra em que o composto

ocorre naturalmente ou em que está presente após a administração), ou em que o composto foi feito (por exemplo, como em um polipeptídeo bacteriano, anticorpo, polipeptídeo, e outros).

[00075] Um "silenciamento genético" ou "*knockout*" no contexto de um gene alvo refere-se a uma alteração na sequência do gene que resulta em uma diminuição da função do gene alvo, por exemplo, de modo que a expressão o gene alvo torne-se indetectável ou insignificante, e/ou o produto gênico não seja funcional ou não significativamente funcional. Por exemplo, um "silenciamento genético" de um gene envolvido na síntese de LPS indica que a função do gene foi diminuída substancialmente de modo que a expressão do gene não é detectável ou está apenas presente em níveis insignificantes e/ou uma atividade biológica do produto gênico (por exemplo, uma atividade enzimática) é significativamente reduzida com relação a antes da modificação ou não é detectável. "Silenciamentos genéticos" abrangem silenciamentos genéticos condicionais onde a alteração do gene alvo pode ocorrer, por exemplo, sob exposição a um conjunto predefinida de condições (por exemplo, temperatura, osmolaridade, exposição a substâncias que promovem alteração do gene alvo, e outros. Uma "alteração gênica de função" ou "*knockin*" de um gene alvo refere-se a uma alteração genética em um gene que resulta em um aumento em uma função fornecida pelo gene alvo.

POLIPEPTÍDEOS DE fHbp COM PROPRIEDADES ALTERADAS DE LIGAÇÃO DE fH

[00076] Antes de descrever mais fHbps contempladas pela revelação presente, é útil descrever algumas fHbps de ocorrência natural. fHbps únicas de ocorrência natural encontradas em *N. meningitidis* são cada atribuídas a um peptídeo de fHbp ID de acordo com os sítios de rede *Neisseria.org* e pubmlst.org/Neisseria/fHbp. Esta convenção de nomear fHbps será adotada ao longo da revelação presente.

[00077] Para conveniência e clareza, a sequência de aminoácidos nativa de fHbp ID 1 (fHbp de v.1 da cepa de *N. meningitidis* MC58) é selecionada como uma sequência de referência para todas as sequências de aminoácidos de fHbp de ocorrência natural e não-natural, abrangendo variantes quiméricas e/ou de fHbps descritas aqui. A sequência de aminoácidos de fHbp ID 1 é mostrada na Figura 45 e apresentada abaixo:

fHbp ID 1

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKL-
KLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLES-
GEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDI-
AGEHTSFDKLP EGGRATYRGTAFGSDDA-
GGKLTYTIDFAAKQGNGKIEHLKSP ELNVDLAAADIKPDGKRHAVIS-
GSVLYNQA EKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ
(SEQ ID NO: 1).

[00078] Em referência a uma posição do resíduo de aminoácido em uma fHbp, o número da posição aqui usado corresponde ao número do resíduo de aminoácido de fHbp ID 1. Vide Figura 19 para um alinhamento de várias fHbps e os resíduos de aminoácido em cada fHbp que corresponde àqueles de fHbp ID 1. Como visto na Figura 19 e SEQ ID NO: 1, número de posição 1 refere-se ao primeiro resíduo de aminoácido mostrado em fHbp ID 1, que é uma cisteína. A fHbp referida aqui às vezes pode conter uma sequência líder adicional ao término N. Por exemplo, fHbp ID 1 pode ter uma sequência líder de MNRTAFCCLS-LTTALILTA (SEQ ID NO: 16) no término N. Porém, o número de posição do aminoácido 1 em qualquer fHbp ainda é definido aqui como a posição que corresponde à cisteína na posição de aminoácido 1 mostrada acima para fHbp ID 1 em um alinhamento, cujo aminoácido é o primeiro resíduo na sequência líder, se presente. Vide Figura 19 para detalhes.

[00079] A revelação presente fornece fHbps, composições compreendendo as mesmas, e métodos de uso das fHbps e das composições. Uma fHbp em questão tem uma afinidade mais baixa por fH humano que uma fHbp de referência correspondente (por exemplo, uma fHbp que é de ocorrência natural; ou outra fHbp de referência). Porque uma fHbp de afinidade alta tem uma probabilidade alta de ser complexada com fH, o fH ligado podem mascarar um ou mais epítomos na fHbp do sistema imune de um hospedeiro. Consequentemente, fHbp que é complexada e/ou ligada com fH pode não ser um imunógeno tão efetivo que uma fHbp que não é assim complexada. Inversamente, as fHbps que tem uma afinidade relativamente baixa por fH, quando administradas como um imunógeno (por exemplo, em uma composição de vacina), podem apresentar epítomos ao sistema imune de um hospedeiro imunizado que uma fHbp que tem afinidade alta por fH não, tais epítomos podem ser mascarados por fH ligado. As fHbps em questão têm uma afinidade baixa por fH humano e são úteis em suscitar anticorpos bactericidas e/ou fornecer imunidade protetora contra *N. meningitidis*. Uma fHbp em questão é uma fHbp de ocorrência não-natural. Uma fHbp de ocorrência não-natural não é encontrada na natureza e é feita pelo homem e/ou intencionalmente modificada pelo homem. Uma fHbp em questão de ocorrência não-natural pode ser feita por meio de síntese química ou métodos recombinantes.

[00080] Como aqui usado, "afinidade baixa", "afinidade mais baixa", ou "aglutinante de fH baixo" referem-se à fHbps que tem uma afinidade de ligação por um fH humano que é tão baixo quanto ou inferior à da fHbp ID 1. Consequentemente, as fHbps em questão podem abranger fHbp ID 14 e fHbp 15 uma vez que a fHbp ID 14 e fHbp ID 15 tem uma afinidade inferior por fH humano com relação à fHbp ID 1.

[00081] A afinidade de ligação das fHbps de afinidade baixa e fH humano pode ser não mais que cerca de 100%, não mais que cerca

de 95%, não mais que cerca de 90%, não mais que cerca de 85%, mais que cerca de 80%, não mais que cerca de 75%, não mais que cerca de 70%, não mais que cerca de 65% vezes, não mais que cerca de 60%, não mais que cerca de 50%, não mais que cerca de 45% ou menos da afinidade de fHbp de afinidade alta (por exemplo, fHbp ID 1) e fH humano. Por exemplo, uma fHbp em questão pode ter uma afinidade por fH humano que é menos que cerca de 50% da afinidade de fHbp ID 1 por fH humano.

[00082] Em algumas modalidades, a afinidade de ligação de uma fHbp de ocorrência não-natural em questão por fH humano é 85% ou menos da afinidade de ligação de uma fHbp do tipo selvagem para fH humano. Por exemplo, em algumas modalidades, a afinidade de ligação de uma fHbp de ocorrência não-natural em questão por fH humano é de cerca de 85% a cerca de 75%, de cerca de 75% a cerca de 65%, de cerca de 65% a cerca de 55%, de cerca de 55% a cerca de 45%, de cerca de 45% a cerca de 35%, de cerca de 35% a cerca de 25%, de cerca de 25% a cerca de 15%, de cerca de 15% a cerca de 10%, de cerca de 10% a cerca de 5%, de cerca de 5% a cerca de 2%, de cerca de 2% a cerca de 1%, ou de cerca de 1% a cerca de 0,1%, ou menos que 0,1%, da afinidade de ligação de uma fHbp do tipo selvagem por fH humano. Como um exemplo, em algumas modalidades, a afinidade de ligação de uma fHbp de ocorrência não-natural em questão por fH humano é de cerca de 85% a cerca de 75%, de cerca de 75% a cerca de 65%, de cerca de 65% a cerca de 55%, de cerca de 55% a cerca de 45%, de cerca de 45% a cerca de 35%, de cerca de 35% a cerca de 25%, de cerca de 25% a cerca de 15%, de cerca de 15% a cerca de 10%, de cerca de 10% a cerca de 5%, de cerca de 5% a cerca de 2%, de cerca de 2% a cerca de 1%, ou de cerca de 1% a cerca de 0,1%, ou menos que 0,1%, da afinidade de ligação de fHbp ID 1 por fH humano.

[00083] Por exemplo, em algumas modalidades, a afinidade de ligação de um sujeito mutante de fHbp ID 1 (por exemplo, um R41S, R41A, R130A, H119A, E218A, ou um E239A mutante de fHbp ID 1) por fH humano é de cerca de 85% a cerca de 75%, de cerca de 75% a cerca de 65%, de cerca de 65% a cerca de 55%, de cerca de 55% a cerca de 45%, de cerca de 45% a cerca de 35%, de cerca de 35% a cerca de 25%, de cerca de 25% a cerca de 15%, de cerca de 15% a cerca de 10%, de cerca de 10% a cerca de 5%, de cerca de 5% a cerca de 2%, de cerca de 2% a cerca de 1%, ou de cerca de 1% a cerca de 0,1%, ou menos que 0,1%, da afinidade de ligação de fHbp ID 1 por fH humano.

[00084] Como outro exemplo, em algumas modalidades, a afinidade de ligação de um sujeito mutante de fHbp ID 4, ID 9, ou ID 74 (por exemplo, um mutante R41S de fHbp ID4, ID9, ou ID74) por fH humano é de cerca de 85% a cerca de 75%, de cerca de 75% a cerca de 65%, de cerca de 65% a cerca de 55%, de cerca de 55% a cerca de 45%, de cerca de 45% a cerca de 35%, de cerca de 35% a cerca de 25%, de cerca de 25% a cerca de 15%, de cerca de 15% a cerca de 10%, de cerca de 10% a cerca de 5%, de cerca de 5% a cerca de 2%, de cerca de 2% a cerca de 1%, ou de cerca de 1% a cerca de 0,1%, ou menos que 0,1%, da afinidade de ligação de fHbp ID4, ID9, ou ID74 por fH humano, ou da afinidade de ligação de fHbp ID 1 por fH humano.

[00085] Como outro exemplo, em algumas modalidades, a afinidade de ligação de um sujeito mutante de fHbp ID 22 (por exemplo, um mutante R80A, D211A, E218A, E248A, G236I, ou T220A/H222A de fHbp ID22) por fH humano é de cerca de 85% a cerca de 75%, de cerca de 75% a cerca de 65%, de cerca de 65% a cerca de 55%, de cerca de 55% a cerca de 45%, de cerca de 45% a cerca de 35%, de cerca de 35% a cerca de 25%, de cerca de 25% a cerca de 15%, de cerca de 15% a cerca de 10%, de cerca de 10% a cerca de 5%, de cerca de 5%

a cerca de 2%, de cerca de 2% a cerca de 1%, ou de cerca de 1% a cerca de 0,1%, ou menos que 0,1%, da afinidade de ligação de fHbp ID 22 para fH humano, ou da afinidade de ligação de fHbp ID 1 por fH humano.

[00086] Como outro exemplo, em algumas modalidades, a afinidade de ligação de um sujeito mutante de fHbp ID 77 (por exemplo, um R41S/K113A, R41S/K119A, R41S/D121A, ou um R41S/K113A/D121A mutante de fHbp ID 77) para fH humano é de cerca de 85% a cerca de 75%, de cerca de 75% a cerca de 65%, de cerca de 65% a cerca de 55%, de cerca de 55% a cerca de 45%, de cerca de 45% a cerca de 35%, de cerca de 35% a cerca de 25%, de cerca de 25% a cerca de 15%, de cerca de 15% a cerca de 10%, de cerca de 10% a cerca de 5%, de cerca de 5% a cerca de 2%, de cerca de 2% a cerca de 1%, ou de cerca de 1% a cerca de 0,1%, ou menos que 0,1%, da afinidade de ligação de fHbp ID 77 por fH humano, ou da afinidade de ligação de fHbp ID 1 por fH humano.

[00087] Como outro exemplo, em algumas modalidades, a afinidade de ligação de um sujeito mutante de fHbp ID 28 (por exemplo, um mutante E218A ou fHbp ID 28; um mutante K199A de fHbp ID 28) por fH humano é de cerca de 85% a cerca de 75%, de cerca de 75% a cerca de 65%, de cerca de 65% a cerca de 55%, de cerca de 55% a cerca de 45%, de cerca de 45% a cerca de 35%, de cerca de 35% a cerca de 25%, de cerca de 25% a cerca de 15%, de cerca de 15% a cerca de 10%, de cerca de 10% a cerca de 5%, de cerca de 5% a cerca de 2%, de cerca de 2% a cerca de 1%, ou de cerca de 1% a cerca de 0,1%, ou menos que 0,1%, da afinidade de ligação de fHbp ID 28 por fH humano, ou da afinidade de ligação de fHbp ID 1 por fH humano.

[00088] Afinidade de ligação pode ser descrita em termos da constante de dissociação (K_d). FHbps de afinidade baixa e fH humano podem ter uma constante de dissociação (K_d ; M) que é pelo menos mais

que cerca de 80%, pelo menos mais que cerca de 100%, pelo menos mais que cerca de 120%, pelo menos mais que cerca de 140%, pelo menos mais que cerca de 160%, pelo menos mais que cerca de 200%, ou mais que a K_d de fHbps de afinidade alta (por exemplo, fHbp ID 1) e fH humano. A K_d de uma fHbp de afinidade baixa pode também ser descrita como cerca de 2X (2 vezes), cerca de 3X, cerca de 5X, cerca de 10X, cerca de 15X, cerca de 20X, até cerca de 50 ou mais vezes a K_d de fHbp ID 1. Por exemplo, uma fHbp em questão e fH humano podem ter uma K_d que é 110% ou cerca de 15X à da fHbp ID 1 e fH humano.

[00089] Como aqui usado, "afinidade inferior para fH humano que uma fHbp correspondente" é usado para descrever fHbps que têm uma afinidade de ligação inferior que uma fHbp de referência correspondente.

[00090] Em muitos casos, a fHbp correspondente (a "fHbp de referência") usada para comparar as afinidades de ligação de fHbps em questão é fHbp ID 1. Outra fHbp correspondente que podem ser representativa como uma referência inclui fHbp de variante 2 (por exemplo, fHbp ID 22 ou 77), variante 3 (por exemplo, fHbp ID 28) (Massignani et al (2003) *J Exp Med* 197:789-99 e Pajon R et al (2010) *Vaccine* 28:2122-9), outras fHbps de variante 1 (por exemplo, fHbp ID 4, 9, ou 94), uma fHbp quimérica de ocorrência natural, ou uma quimérica artificial.

[00091] As sequências de aminoácidos de alguns exemplos de fHbps de ocorrência natural e um artificial quimérica são fornecidas abaixo e mostradas na Figura 45.

FHbp ID 22

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKL-
KLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLES-
GEFQIYKQDHSVAVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGL-

GGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTK-
KQGYGRIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKG-
TYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO: 2)

FHbp ID 28

CSSGGGGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLE-
DSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKLNKNDKIS-
RFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDS-
LINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGR-
LHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVIL-
GDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ
(SEQ ID NO: 3)

FHbp ID 77

CSSGGGGVAADIGARLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKL-
KLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLES-
GEFQIYKQDHSAAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGL-
GGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKI-
EHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALF-
GDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO: 4)

FHbp ID 15

CSSGGGGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIS-
QNGTLTLSAQGAERTFKAGDKDNSLNTGKLNKNDKISRDFIRQIEVD-
GQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRI-
GDIVGEHTSFGKLPKDVMTYRGTAFGSDDA-
GGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDEKHHAVIS-
GSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAAKQ
(SEQ ID NO: 5)

FHbp ID 6

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKL-
KLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKNDKVSFRDFIRQIEVNGQLITLES-
GEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSRKMVAKRQFRIGDI-

AGEHTSFDKLPKGDSATYRGTAFGSDDA-
 GGKLYTIDFAAKQGYGKIEHLKSPELNVDLAAAYIKPDEKHHAVIS-
 GSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVKTANGIRHIGLAAKQ
 (SEQ ID NO: 6)

FHbp ID 14

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKL-
 KLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLES-
 GEFQVYKQSHSALTALQTEQEQQDPEHSGKMVAKRRFKIGDI-
 AGEHTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDDA-
 GGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKHHAVIS-
 GSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ
 (SEQ ID NO: 7)

Quimera I

cssggggvaadigagladaltapldhkdkglsitldqsvrkneklklaaqaektygngds-
 lntgklkndkvsrfdfirqievvgqlitlesgefvykqshsalfqteqieqdsehsgk-
 mvakrqfrigidiaGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDA-
 GGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVIL-
 GDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ
 (SEQ ID NO: 8) (Beernink et al. (2008) *Infec. Immun.* 76:2568-2575).

Como observado na Figura 45, as letras minúsculas correspondem à sequência de aminoácidos que é derivada de fHbp ID 1 enquanto as letras maiúsculas correspondem ao aminoácido que é derivado de fHbp ID 77. Posição que corresponde a R41 em fHbp ID 1 é "r" em letra minúscula em negrito.

[00092] A fHbp correspondente pode ser uma fHbp de ocorrência natural e/ou de ocorrência não-natural (por exemplo, quimérica artificial) da qual a fHbp em questão é derivada. Quimérica de ocorrência natural abrange fHbp que tem segmentos variáveis derivados de progenitores diferentes (α ou β). Devido aos segmentos variáveis, a arquitetura molecular foi mostrada ser modular e as variantes de fHbp po-

dem ser subclassificadas em grupos modulares de acordo com as combinações diferentes de cinco segmentos variáveis, cada derivado de uma das duas linhagens genéticas, designadas tipos α ou β (Pajon R et al. (2010) *Vaccine* 28:2122-9; Beernink PT, Granoff DM (2009) *Microbiology* 155:2873-83). Seis grupos modulares, designados I a VI respondem por >95% de todas as variantes de fHbp conhecidas (Pajon R et al. (2010) *Vaccine* 28:2122-9). Vide Figura 16 para as arquiteturas dos grupos modulares de fHbps de ocorrência natural.

[00093] A fHbp correspondente pode ser uma fHbp que tem uma identidade de sequência de aminoácidos alta como a fHbp em questão (por exemplo, pelo menos cerca de 99%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 80%, ou pelo menos cerca de 75% de identidade de sequência de aminoácidos) ou em um segmento (por exemplo, segmento variável como definido em uma arquitetura modular) ou na proteína madura completa.

[00094] FHbps correspondentes usados como referências para comparar as afinidades de ligação de fHbp em questão podem também abranger fHbps que têm um ou mais segmentos do mesmo progenitor (α ou β) em segmentos correspondentes da fHbp em questão.

[00095] A fHbp em questão podem compreender uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99%, identidade de sequência de aminoácidos com uma fHbp de referência; e difere da sequência de aminoácidos da fHbp de referência por de 1 aminoácido (aa) a 10 aminoácidos, por exemplo, difere da sequência de aminoácidos da fHbp de referência por 1 aa, 2 aa, 3 aa, 4 aa, 5 aa, 6 aa, 7 aa, 8 aa, 9 aa, ou 10 aa. Desse modo, por exemplo, uma fHbp em questão pode ter uma, no máximo duas, no máximo no

máximo três, no máximo quatro, até no máximo 10 ou mais modificações (por exemplo, substituições, deleções, ou inserções) com relação a uma fHbp de ocorrência natural e/ou de ocorrência não-natural (por exemplo, quimérica) da qual a fHbp em questão é derivada. A uma ou mais alterações de aminoácido podem diminuir a afinidade da fHbp por fH humano com relação a uma fHbp que não é alterado. Como observado acima, fHbps dos quais a fHbp em questão é derivado abrangem fHbps de ocorrência natural e fHbp de ocorrência não-natural. fHbps de ocorrência não-natural podem abranger quimeras artificiais, tais como aquelas conhecidas na técnica e descritas no Pedido de Patente do PCT WO 2009/114485, a revelação deste é aqui incorporada por referência.

[00096] Desse modo, em algumas modalidades, uma fHbp em questão compreende uma substituição de aminoácido simples com relação a uma fHbp de referência (por exemplo, onde a fHbp de referência for uma fHbp de ocorrência natural (por exemplo, fHbp ID 1, ou uma quimérica artificial). Em algumas modalidades, uma fHbp em questão compreende uma substituição de aminoácido simples (isto é, apenas uma substituição de aminoácido) com relação a uma fHbp de ocorrência natural (por exemplo, fHbp ID 6, fHbp ID 14, fHbp ID 15, fHbp ID 22, fHbp ID 28, fHbp ID 77, ou outra fHbp de ocorrência natural). As sequências de aminoácidos de fHbp ID 1, fHbp ID 15, fHbp ID 22, fHbp ID 28, e fHbp ID 77 são mostradas nas figuras 19 e 45; as sequências de aminoácidos de fHbp ID 6 e fHbp ID 14 são fornecidas acima. Em algumas modalidades, uma fHbp em questão compreende uma substituição de aminoácido simples (isto é, apenas uma substituição de aminoácido) com relação à fHbp ID 1. Em algumas modalidades, uma fHbp em questão compreende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 substituições de aminoácido com relação a uma fHbp de referência. Em algumas modalidades, uma fHbp em questão compreende 2, 3, 4,

5, 6, 7, 8, 9, ou 10 substituições de aminoácido com relação à fHbp ID 1. Em algumas modalidades, uma fHbp em questão compreende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 substituições de aminoácido com relação a uma fHbp de ocorrência natural (por exemplo, fHbp ID 6, fHbp ID 14, fHbp ID 15, fHbp ID 28, como mostrado na Figura 19, ou outra fHbp de ocorrência natural). Em algumas modalidades, uma fHbp em questão compreende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 substituições de aminoácido com relação à sequência de aminoácidos de uma de fHbp ID 1, fHbp ID 15, fHbp ID 22, fHbp ID 28, e fHbp ID 77.

[00097] A posição de resíduo de aminoácido na qual uma alteração é introduzida pode ser determinada comparando as sequências de aminoácidos de aglutinantes de fH baixos (por exemplo, fHbp ID 14 e/ou fHbp ID 15) com fHbps de uma afinidade comparável a fH humano como fHbp ID 1, por exemplo. FHbps de uma afinidade comparável por fH humano como fHbp ID 1 ou mais alta são referidas aqui como "aglutinantes de fH altos". Alguns exemplos de aglutinantes de fH altos incluem fHbp ID 1, fHbp ID 6, e fHbp ID 28. Os aglutinantes de fH baixos e aglutinantes de fH altos que compartilham um ou mais segmentos de progenitor podem ser comparados em um alinhamento de sequência. Vide Figura 19 como um exemplo de um alinhamento de sequência para determinar as alterações de aminoácido que podem ser feitas em uma fHbp de ocorrência natural para chegar à fHbp em questão.

[00098] Uma variante de fHbp em questão pode ser derivada de (por exemplo, pode incluir uma ou mais substituições de aminoácido com relação a) uma fHbp de variante 1, uma fHbp de variante 2, ou uma fHbp de variante 3. Uma variante de fHbp em questão pode ser derivada de (por exemplo, pode incluir uma ou mais substituições de aminoácido com relação a) uma fHbp do grupo I modular, uma fHbp do grupo II modular, uma fHbp do grupo III modular, uma fHbp do grupo

IV modular, uma fHbp do grupo V modular, uma fHbp do grupo VI modular, uma fHbp do grupo VII modular, uma fHbp do grupo VIII modular, uma fHbp do grupo IX modular, ou uma fHbp do grupo X modular.

[00099] Substituições de aminoácido comparadas a uma fHbp de referência que é provável resultar em uma fHbp com afinidade reduzida por fH incluem substituições de aminoácido dos aminoácidos de fHbp que são resíduos de contato para ligar a fH; substituições de aminoácido dos aminoácidos de fHbp que são expostos na superfície; substituições de aminoácido dos aminoácidos de fHbp na interface entre os domínios amino-terminal e carboxila-terminal; e substituições de aminoácido dos aminoácidos de fHbp que são próximos a um resíduo de ligação de fH onde um aminoácido que é "próximo a" um aminoácido de ligação de fH é um aminoácido que é de um a dez resíduos amino-terminal ou carboxila-terminal ao aminoácido de ligação de fH. Em certas modalidades, a substituição de aminoácido que resulta em uma afinidade baixa por fH não é um resíduo de contato de fH. Certos resíduos de contato são mostrados em negrito na Figura 19.

[000100] Onde uma fHbp contém uma substituição de aminoácido com relação à fHbp de ocorrência natural ou com relação a ID 1, a substituição de aminoácido pode ser conservadora com relação àquela substituição de aminoácido. Por exemplo, se R41 for modificado em S, fazendo uma substituição de R41S, e particularmente onde a substituição de R41S resultar em uma afinidade reduzida por fH humano, a revelação presente contempla substituições de aminoácido conservadoras com relação a S, de modo que a substituição de aminoácido R41T é também contemplada.

[000101] A revelação presente fornece uma fHbp de ocorrência não-natural que tem uma substituição de aminoácido na posição 41 com relação à fHbp ID 1, onde a substituição de aminoácido é de uma estrutura que rompe a interação de fHbp com o fator humano H, mas

provê que a fHbp mutante retenha a imunogenicidade. Aminoácidos adequados para substituição na posição 41 com relação à fHbp ID 1 incluem resíduos hidrofóbicos (por exemplo, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro); resíduos polares pequenos (por exemplo, Ser, Cys, Thr, Met, Asn, Gln); resíduos carregados pequenos (por exemplo, Asp, Glu); e resíduos hidrofóbicos grandes (por exemplo, Phe, Trp). Exemplos de substituições que são preditivas para não romper significativamente a interação de fHbp com o fator humano H, e desse modo são para ser evitadas, incluem: resíduos grandes, carregados (por exemplo, Lys).

[000102] Em algumas modalidades, as substituições de aminoácido em um ou mais dos resíduos seguintes são especificamente excluídas: R41, Q38, Q87, Q113, K113, K119, D121, G121, Q126, Q128, R130, D201, E202, E218, A235, E239, e K241. Em algumas modalidades, por exemplo, onde uma fHbp em questão compreender uma substituição de aminoácido simples com relação a uma fHbp de referência (por exemplo, onde a fHbp de referência for uma fHbp de ocorrência natural ou for fHbp ID 1), a substituição de aminoácido simples pode ser na posição E218 ou E239.

[000103] Alterações de aminoácido encontradas nas fHbps em questão abrangem aquelas mostradas como resíduos sombreados e/ou colocados em caixa na Figura 19 e listados abaixo. Em um exemplo de análise de sequência, segmento A (V_A ; resíduos 8-73) de fHbp ID 15 de aglutinante baixo é comparado ao V_A da mesma sequência progenitora em um aglutinante de fH alto, fHbp ID 28. Como tal, os segmentos de V_A tanto de fHbp ID 15 como de fHbp ID 28 são idênticos em sequência de aminoácidos exceto nas posições de resíduo 41 e 60. Como visto na Figura 19, fHbp 15 tem S41 e R60 em V_A ; fHbp ID 28 tem P41 e K60. Com base nesta análise, as posições de resíduo de aminoácido que correspondem a 41 e 60 de fHbp ID 15 são posições candidato nas quais alteração pode ser introduzida para chegar à fHbp em

questão. Em outras palavras, uma fHbp de referência que não tem S e R nas posições de resíduo que correspondem a 41 e 60 de fHbp ID 15, respectivamente, pode ser mutada para ter S e/ou R nas posições que correspondem a 41 e 60 de fHbp ID 15. A fHbp em questão que compreende uma ou mais substituições de aminoácido podem depois ter afinidade inferior por fH humano que sem as substituições (por exemplo, S41P, S41A, R41P, ou R41A). Tais fHbps são abrangidas pelas fHbps em questão e são úteis como imunógeno na suscitação de anticorpos bactericidas em sujeitos em necessidade do mesmo.

[000104] As posições de resíduos candidatos adicionais nas quais uma alteração de aminoácido pode ser introduzida são debatidas nos exemplos abaixo. Por exemplo, uma fHbp da revelação presente pode ter uma substituição de aminoácido em uma ou mais posições que correspondem a um ou mais resíduos de aminoácido selecionados de 41, 60, 114, 113, 117, 119, 121, 128, 130, 147, 148, 149, 178, 195, 218, 239, 241, ou 247 da fHbp ID 1 (por exemplo, com base na numeração de fHbp ID1 madura. Uma fHbp da revelação presente pode ter uma substituição de aminoácido em uma ou mais posições que correspondem a um ou mais resíduos de aminoácido selecionados de 41, 60, 80, 113, 114, 117, 119, 121, 128, 130, 147, 148, 149, 178, 195, 199, 211, 220, 222, 236, 241, 247, ou 248, com base na numeração da fHbp ID 1 madura. Uma fHbp da revelação presente pode ter uma substituição de aminoácido em uma ou mais posições que correspondem a um ou mais resíduos de aminoácido selecionados de 87, 109, 115, 118, 126, 138, 197, 201, 202, 203, 209, 217, 225, 235, ou 245, com base na numeração da fHbp ID 1 madura. Onde a fHbp correspondente for uma fHbp de variante 2 ou variante 3 (ou um respectivo grupo modular correspondente), a modificação pode ser introduzida na posição 113, 119, e/ou 121, ou qualquer combinação das mesmas. Por exemplo, uma fHbp de variante 2 (por exemplo, fHbp ID 77) pode

conter uma substituição em uma ou mais posições em 113, 119, e/ou 121, como também uma substituição da serina na posição 41, ou outra substituição adequada na posição 41 como descrito acima. Onde a fHbp correspondente for um variante ID 22, a modificação pode ser introduzida na posição 80, 211, 218, 220, 222, 236, ou 248, ou qualquer combinação das mesmas.

[000105] Uma proteína de ligação ao fator H variante (fHbp) da revelação presente pode também ter uma substituição de aminoácido em uma ou mais posições que correspondem a um ou mais resíduos de aminoácido selecionados de 60, 114, 117, 147, 148, 149, 178, 195, ou 247 de fHbp ID 1. Outras posições podem ser identificadas usando estudos de alinhamento de sequência entre os aglutinantes baixos de fH e aglutinantes altos de fH, similar ao debatido acima para V_A de fHbp ID 15.

[000106] Uma fHbp variante da revelação presente pode ser uma variante de fHbp ID 1 e pode incluir uma, duas, três, ou quatro das substituições seguintes: R41S, R41A, R130A, H119A, E218A, e E239A. Como debatido acima, uma fHbp variante da revelação presente pode incluir uma substituição de aminoácido simples. Uma fHbp variante da revelação presente pode também incluir uma substituição de aminoácido dupla. Por exemplo, fHbp variante da revelação presente podem incluir substituições em dois de R41S, R41A, R130A, H119A, E218A, e E239A.

[000107] Uma fHbp variante da revelação presente pode ter uma substituição de aminoácido em uma ou mais posições que correspondem a um ou mais resíduos de aminoácido selecionados de 80, 211, 218, 220, 222, 236, e 248 de fHbp ID 1. Posições correspondentes nas variantes de fHbp são facilmente determináveis, por exemplo, dos alinhamentos apresentados na figuras 19, 34, e 35. Como exemplos não limitativos, uma fHbp variante da revelação presente pode ser uma va-

riante de fHbp ID 22 e pode incluir uma, duas, três, ou quatro das substituições seguintes: R80A, D211A, E218A, T220A, H222A, G236I, e E248A. Como debatido acima, uma fHbp variante da revelação presente pode incluir uma substituição de aminoácido simples. Uma fHbp variante da revelação presente pode também incluir uma substituição de aminoácido dupla. Por exemplo, fHbp variante da revelação presente podem incluir substituições em dois de R80, D211, E218, T220, H222, G236, e E248. Como um exemplo não limitativo, uma fHbp variante pode incluir uma substituição dupla T220A/H222A.

[000108] Uma fHbp variante da revelação presente pode ter uma substituição de aminoácido em uma ou mais posições que correspondem a um ou mais resíduos de aminoácido selecionados dos resíduos 41, 113, 119, 121 de fHbp ID 77. Como exemplos não limitativos, uma fHbp variante da revelação presente pode ser uma variante de fHbp ID 77 e pode incluir uma, duas, três, ou quatro das substituições seguintes: R41S, K113A, K119A, e D121A. Como debatido acima, uma fHbp variante da revelação presente pode incluir uma substituição de aminoácido simples. Uma fHbp variante da revelação presente pode também incluir uma substituição de aminoácido dupla. Por exemplo, fHbp variante da revelação presente pode incluir substituições em dois de R41S, K113A, K119A, e D121A. Como um exemplo não-limitativo, uma fHbp variante pode incluir uma substituição dupla R41S/K113A, uma substituição dupla R41S/K119A, ou uma substituição dupla R41S/D121A.

[000109] Uma fHbp variante da revelação presente pode ter uma substituição de aminoácido em uma ou mais posições que correspondem a um ou mais resíduos de aminoácido selecionados dos resíduos 113, 121, 199, e 218 de fHbp ID 28.

[000110] Onde a posição R41 for substituída com serina na fHbp da revelação presente, sua fHbp correspondente pode pertencer a um

dos grupos modulares mostrados na Figura 16. Por exemplo, a fHbp correspondente pode ser de um grupo modular I onde todos os segmentos variáveis são da linhagem de α . Exemplos de tais fHbps em questão incluem mutantes R41S de fHbp IDs 1, 4, 9, e 94. Em algumas modalidades, as fHbps em questão não incluem mutantes que não tem uma afinidade diminuída por fH humano com relação a suas fHbps correspondentes. Por exemplo, as fHbps em questão não incluem mutantes R41S de fHbp IDs 19 e 22.

fHbps QUIMÉRICAS

[000111] Como observado acima, uma ou mais modificações podem ser introduzidas em uma fHbp de ocorrência natural ou uma fHbp artificial (por exemplo, fHbp quimérica artificial). A modificação pode abranger uma modificação em um segmento ou um domínio enquanto os outros segmentos e/ou domínios podem ser derivados de qualquer fHbp (por exemplo, uma fHbp de ocorrência natural de um grupo variante diferente).

[000112] Em uma fHbp descrita como tendo uma arquitetura modular de segmentos de V_A , V_B , V_C , V_D , e V_E , a modificação pode ser introduzida em V_A de uma linhagem de α (por exemplo, R41S em V_A de fHbp ID 1) enquanto os outros segmentos da fHbp (por exemplo, V_B , V_C , V_D , e V_E) podem, cada, ser independentemente derivados de qualquer linhagem, qualquer grupo variante, ou qualquer fHbp ID. Em outro exemplo, os segmentos de V_A , V_C , e V_E de uma fHbp em questão podem ser derivados da linhagem de α (linhagem 1) enquanto V_B , e V_D podem ser de uma linhagem de β . Onde a modificação uma substituição de arginina estiver na posição 41 com serina, a modificação é introduzida em V_A de um progenitor de α ($V_{A\alpha}$). O segmento de V_A refere-se a uma sequência de aminoácidos contígua que inicia na posição de resíduo 7 e termina na posição de resíduo 73, em que o número de posição corresponde àqueles da sequência de referência, fHbp ID 1.

[000113] Uma fHbp da revelação presente pode conter uma mutação de R41S em um segmento de $V_{A\alpha}$ que contém uma sequência de aminoácidos que é pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de 94%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99%, até 100% idêntica à sequência seguinte:

VA**A**D**I**G**A**G**L**A **D**A**L**T**A**P**L**D**H**K **D**K**S**L**Q**S**L**T**L**D **Q****S****V****R****K****N****E****K****L****K**
LA**A****Q****G****A****E****K**T**Y** **G****N****G****D**S**L****N** **T****G****K****L****K****N****D****K**V (SEQ ID NO: 17). Sequência de $V_{A\alpha}$ é mostrada aqui com a mutação R41S em negrito. Uma fHbp que contém a modificação de R41S desse modo tem a mutação de R41S em um segmento de $V_{A\alpha}$ e pode ter segmentos de V_B , V_C , V_D , e V_E , cada independentemente derivado de qualquer outra fHbp (por exemplo, uma linhagem diferente, um grupo variante diferente, ou mutantes de fHbp).

[000114] Uma fHbp quimérica da revelação presente pode também ser descrita como tendo uma modificação no domínio N-terminal (fHbpN) da fHbp enquanto o domínio C-terminal (fHbpC) pode ser derivado de uma fHbp diferente (por exemplo, um grupo variante diferente ou uma linhagem diferente). "fHbpN" refere-se a uma sequência de aminoácidos contígua que inicia aproximadamente na posição de resíduo 8 e termina aproximadamente na posição de resíduo 136. "fHbpC" refere-se a uma sequência de aminoácidos contígua que inicia aproximadamente na posição de resíduo 141 e termina aproximadamente na posição de resíduo 255. Sequência interveniente entre fHbpN e fHbpC é um ligador entre os dois domínios. Como um exemplo, a fHbpN de uma fHbp em questão pode conter uma mutação de R41S em uma sequência derivada de fHbp ID 1 enquanto a fHbpC é derivada da fHbp de variante 2 ou variante 3 (por exemplo, fHbp ID 77).

[000115] A fHbp quimérica correspondente pode ser de qualquer quimérica artificial conhecida, tal como aquelas descritas em Beernink

et al. (2008) *Infec. Immun.* 76:2568-2575 e WO 2009/114485, a revelação deste é incorporada aqui por referência. A quimérica contendo a modificação tem uma afinidade diminuída por fH humano com relação à fHbp quimérica correspondente, enquanto ainda mantendo epítomos importantes para suscitar a resposta bactericida, tal como aqueles encontrados na fHbp quimérica correspondente. Epítomos de fHbp que podem ser mantidos na quimérica modificada incluem aqueles que são encontrados na fHbp quimérica correspondente tal como aqueles descritos em WO 2009/114485, revelação desta é incorporada aqui por referência. Por exemplo, uma fHbp quimérica modificada pode conter epítomos importantes para suscitar a resposta de anticorpo bactericida contra cepas que contêm fHbp de variante 1 (por exemplo, epítomos no domínio N-terminal tais como aqueles definidos por mAb JAR 4 e/ou JAR 5) e/ou contra cepas contendo fHbp de variante 2 ou 3 (por exemplo, epítomos definidos por mAb JAR 10, JAR 11, JAR 13, e/ou JAR 36). Por exemplo, a mutação de R41S é uma modificação que pode ser introduzida na fHbp quimérica mostrada nas figuras 19 e 45 para diminuir a ligação ao fH humano ao mesmo tempo ainda mantendo os epítomos de JAR 4 e JAR 5.

[000116] Uma característica de uma fHbp em questão é que quando administrada a um hospedeiro (por exemplo, mamíferos tais como camundongos ou humano), a fHbp em questão podem suscitar uma resposta bactericida a um nível comparável ou mais alto que a resposta bactericida suscita através de fHbp ID 1, ou outra referência correspondente (por exemplo, fHbp ID 4, 9, 22, 28, 74, ou 77). Métodos para determinar os níveis de resposta bactericida são conhecidos na técnica e descritos na seção de Exemplo abaixo. Por exemplo, as titulações bactericidas da média geométrica dos camundongos imunizados com a fHbp em questão são pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo

menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 100%, pelo menos cerca de 110%, pelo menos cerca de 120%, pelo menos cerca de 150%, pelo menos cerca de 175%, pelo menos cerca de 200%, ou mais que 200%, das titulações bactericidas da média geométrica de camundongos imunizados com fHbp ID 1. Em algumas circunstâncias, a titulação bactericida da média geométrica de um camundongo imunizado com uma fHbp em questão é pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 10 vezes, ou mais que 10 vezes, mais alta que a titulação bactericida da média geométrica de um camundongo de controle imunizado com fHbp ID 1.

[000117] As fHbps em questão podem excluir aquelas que suscitam uma resposta bactericida significativamente inferior que a que suscita através de fHbp ID 1. As fHbps em questão podem excluir fHbp que tem mutações em ambas as posições de resíduo 218 e 239 (por exemplo, mutante duplo E218A/E239A). Em algumas modalidades, as fHbps em questão abrangem apenas fHbps de ocorrência não-natural; como tal, em algumas modalidades, uma fHbp em questão exclui fHbps de ocorrência natural.

[000118] Em muitos casos, uma variante de fHbp em questão mantém e apresenta um epítipo conformacional ligado por anticorpos bacterianos que têm atividade bactericida contra uma ou mais cepas de *Neisseria meningitidis*. Desse modo, tais mutantes de fHbp podem manter um epítipo encontrado em uma fHbp de ocorrência natural, enquanto exibindo ligação reduzida ao fH comparado à afinidade de ligação por fH de uma fHbp de ocorrência natural. Variantes que têm efeito mínimo ou nenhum na conformação de fHbp de modo que a vacina mutante suscite anticorpos bactericidas são consideradas bons candidatos de vacina. Se uma variante tem um efeito na conformação de fHbp pode ser determinado de vários modos, incluindo ligação dos anticorpos listados na Tabela 9.

[000119] As fHbps da revelação presente podem ter características adicionais, descritas em mais detalhe abaixo.

CONJUGADOS

[000120] As fHbps em questão da revelação presente podem conter um ou mais elementos adicionais no término N e/ou C do polipeptídeo, tal como um polipeptídeo (por exemplo, tendo uma sequência de aminoácidos heterólogos para a fHbp em questão) e/ou uma molécula de veículo. As sequências de aminoácidos heterólogos adicionais podem ser fundidas, por exemplo, para fornecer uma metionina N-terminal ou derivado da mesma (por exemplo, piroglutamato) como resultado da expressão em uma célula hospedeira bacteriana (por exemplo, *E. coli*) e/ou fornecer um polipeptídeo quimérico que tem um par de fusão em seu término N ou término C. Pares de fusão de interesse incluem, por exemplo, glutathione-S-transferase (GST), proteína ligadora de maltose (MBP), marcador His6, e outros, como também peptídeos líderes de outras proteínas, particularmente lipoproteínas. Os pares de fusão podem prover características adicionais, tais como facilitando o isolamento, purificação, detecção, imunogenicidade da fHbp em questão.

[000121] Outros elementos que podem ser ligados à fHbp em questão incluem uma molécula de veículo (por exemplo, uma proteína de veículo, por exemplo hemocianina de lapa (KLH)). Elementos adicionais podem ser ligados ao peptídeo por meio de um ligador, por exemplo, um ligador flexível. Veículos abrangem imunomoduladores, uma molécula que direta ou indiretamente modifica uma resposta imune. Uma classe específica de imunomoduladores inclui aqueles que estimulam ou auxiliam na estimulação de uma resposta imunológica. Exemplos incluem antígenos e veículos de antígeno tais como uma toxina ou seu derivado, incluindo toxoide de tétano. Outras moléculas de veículo que facilitam a administração e/ou aumentam a imunogenicidade em um sujeito a ser vacinado ou tratado contra *N. meningitidis*

são também contempladas. Moléculas de veículo podem também facilitar a liberação a uma célula ou tecido de interesse. A metade adicional pode também ajudar na imunogenicidade ou formação de um complexo com um componente em uma vacina. As moléculas de veículo podem agir como uma proteína de andaime para facilitar a exibição dos epítomos em uma superfície da membrana (por exemplo, uma vacina de vesícula).

[000122] Em um exemplo, as fHbps em questão são modificadas no término N e/ou término C para incluir um ácido graxo (por exemplo, grupo ácido carboxílico alifático). O ácido graxo pode ser covalentemente ligado à fHbp por meio de um ligador flexível. Um exemplo de um ácido graxo que pode ser usado para modificar uma extremidade (por exemplo, extremidade N-terminal, por exemplo, no término N) da fHbp em questão é ácido láurico. Ácido láurico quando covalentemente ligado a outra molécula é referido como um grupo lauroíla (por exemplo, sulfato de lauroíla). Ácido láurico contém doze átomos de carbono com dez grupos metileno e a fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{10}\text{-COOH}$. Outros ácidos graxos que podem ser ligados aos peptídeos em questão incluem ácido caprílico (10 C), ácido mirístico (14 C), e ácido palmítico (16 C). Para detalhes, vide Westerink MA et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4021-4025. É também contemplado que qualquer metade hidrofóbica que possa servir para ancorar a fHbp em questão na membrana externa bacteriana é contemplada aqui para conjugação com uma extremidade N e/ou C-terminal (por exemplo, ao término N) das fHbps da revelação presente, onde a metade hidrofóbica pode ser opcionalmente conjugada com o peptídeo através de um ligador, por exemplo, um ligador flexível, como descrito aqui. Por exemplo, um pentapeptídeo hidrofóbico FLLAV (SEQ ID NO: 18), como descrito em Lowell GH et al. (1988) *J. Exp. Med.* 167:658-63.

[000123] Como observado acima, um modo em que o ácido graxo,

como também outros elementos adicionais descritos acima, é conectado à fHbp é por meio de um ligador (por exemplo, lauroil-Gly-Gly). Ligadores adequados para o uso na modificação da fHbp da revelação presente incluem "ligadores flexíveis". Ligadores adequados podem ser facilmente selecionados e podem ser de qualquer de um adequado dos comprimentos diferentes, tais como de 1 aminoácido (por exemplo, Gly) a 20 aminoácidos, de 2 aminoácidos a 15 aminoácidos, de 3 aminoácidos a 12 aminoácidos, incluindo 4 aminoácidos a 10 aminoácidos, 5 aminoácidos a 9 aminoácidos, 6 aminoácidos a 8 aminoácidos, ou 7 aminoácidos a 8 aminoácidos, e podem ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, ou 7 aminoácidos.

[000124] Exemplos de ligadores flexíveis incluem polímeros de glicina (G)_n, polímeros de glicina-serina (incluindo, por exemplo, (GS)_n, GSGGS_n (SEQ ID NO: 19) e GGGS_n (SEQ ID NO: 20), onde n é um número inteiro de pelo menos um), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina, e outros ligadores flexíveis conhecidos na técnica. Polímeros de glicina e de glicina-serina são de interesse uma vez que ambos destes aminoácidos são relativamente não estruturados, e portanto podem servir como uma ligação neutra entre os componentes. Polímeros de glicina são de interesse particular uma vez que a glicina acessa significativamente mais espaço de Ramachandran (ou phi-psi) que até mesmo a alanina, e são muito menos restritos que os resíduos com cadeias laterais mais longas (vide Scheraga, *Rev. Computational Chem.* 11173-142 (1992)). Ligadores flexíveis exemplares incluem, mas não são limitados a GGSG (SEQ ID NO: 21), GGSGG (SEQ ID NO: 22), GSGSG (SEQ ID NO: 23), GSGGG (SEQ ID NO: 24), GGGSG (SEQ ID NO: 25), GSSSG (SEQ ID NO: 26), e outros. O artesão normalmente versado reconhecerá que projeto de uma fHbp conjugada com qualquer elemento descrito acima pode incluir ligadores que são todo ou parcialmente flexíveis, de modo que o

ligador pode incluir um ligador flexível como também uma ou mais porções que conferem estrutura menos flexível.

[000125] FHbp nativa usualmente contém uma cisteína N-terminal à qual uma metade de lipídio pode ser covalentemente ligada. Este resíduo de cisteína é usualmente lipidada na proteína de ocorrência natural, e pode ser lipidada nas fHbps em questão reveladas aqui. Desse modo, nas sequências de aminoácidos descritas aqui, referência à "cisteína" ou "C" nesta posição especificamente inclui referência tanto a uma cisteína inalterada como também a uma cisteína que é lipidada (por exemplo, devido à modificação pós-translacional). Desse modo, a fHbp em questão pode ser lipidada ou não-lipidada. Métodos para produção de proteínas lipidadas *in vitro*, (vide, por exemplo, Andersson et al. (2001) *J. Immunological Methods* 255:135-48) ou *in vivo* são conhecidos na técnica. Por exemplo, fHbp lipidada foi previamente purificada da fração de membrana de proteína de *E. coli* através de extração de detergente (Fletcher et al. (2004) *Infection and Immunity* 72:2088-100), cujo método pode ser adaptado para a produção de fHbp lipidada. Proteínas lipidadas podem ser de interesse visto que tais podem ser mais imunogênicas que a proteína solúvel (vide, por exemplo, Fletcher et al. (2004) *Infection and Immunity* 72:2088-100).

[000126] Será apreciado que as sequências de nucleotídeo que codificam fHbps heterólogas podem ser modificadas para otimizar o uso de códon para facilitar a expressão em uma célula hospedeira de interesse (por exemplo, *E. coli*, *N. meningitidis*, humana (como no caso de uma vacina baseada em DNA), e outros). Métodos para a produção de sequências de códons otimizadas são conhecidos na técnica.

ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAM fHbp

[000127] A revelação presente fornece um ácido nucleico que codifica uma fHbp em questão. Um ácido nucleico em questão, em algumas modalidades, estará presente em uma construção de expressão re-

combinante. Também fornecidas são células hospedeiras geneticamente modificadas compreendendo um ácido nucleico em questão.

[000128] Polipeptídeos de fHbp, e ácidos nucleicos de codificação da revelação presente podem ser derivados de qualquer cepa de *N. meningitidis* adequada. Como é conhecido na técnica, as cepas de *N. meningitidis* são divididas em grupos serológicos (grupos capsulares), sorotipos (fenótipos de PorB) e subtipos (fenótipos de PorA) com base nas reações com anticorpos policlonais (Frasch, C. E. e Chapman, 1973, *J. Infect. Dis.* 127: 149-154) ou monoclonais que interagem com antígenos de superfície diferentes. Agrupamento capsular foi tradicionalmente com base nas variações imunologicamente detectáveis no polissacarídeo capsular mas está sendo substituído por PCR de genes que codificam enzimas específicas responsáveis pela biossíntese dos polissacarídeos capsulares estruturalmente diferentes. Cerca de 12 grupos capsulares (incluindo A, B, C, X, Y, Z, 29-E, e W-135) são conhecidos. Cepas dos grupos capsulares A, B, C, Y e W-135 respondem por quase toda doença meningocócica. Sorotipagem foi tradicionalmente com base nas diferenças antigênicas definidas pelo anticorpo monoclonal em uma proteína de membrana externa chamada Porina B (PorB). Anticorpos que definem cerca de 21 sorotipos são correntemente conhecidos (Sacchi et al., 1998, *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 5:348). Sorotipagem baseou-se em variações antigênicas definidas por anticorpo em uma proteína de membrana externa chamada Porina A (PorA). Sorotipagem e sorosubtipagem estão sendo substituídas por PCR e/ou sequenciação de DNA para identificação dos genes que codificam as regiões variáveis de PorB e PorA, respectivamente que estão associados com reatividade de mAb (por exemplo, Sacchi, Lemos et al., supra; Urwin et al., 1998, *Epidem. and Infect.* 120:257).

[000129] Embora cepas de *N. meningitidis* de qualquer grupo capsular possam ser usadas, cepas de *N. meningitidis* do grupo capsular B

podem ser fontes das quais o ácido nucleico que codifica fHbp e seus domínios é derivado.

[000130] Ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos de fHbp para o uso na construção da fHbps em questão contempladas aqui são conhecidos na técnica. Várias fHbps e suas sequências estão disponíveis nos sítios da rede *Neisseria.org* e *pubmlst.org/Neisseria/fHbp*. Exemplos de polipeptídeos de fHbp são também descritos, por exemplo, no pedido de patente US 61/174.424, pedido de patente do PCT PCT/US09/36577, WO 2004/048404; Masignani et al. (2003) *J Exp Med* 197:789-799; Fletcher et al. (2004) *Infect Immun* 72:2088-2100; Welsch et al. *J Immunol* 2004 172:5606-5615; e WO 99/57280. Ácido nucleico (e sequências de aminoácidos) para variantes de fHbp e subvariantes é também fornecido no GenBank como nos. de acesso: NC_003112, GeneID: 904318 (NCBI Ref. NP_274866), fHbp ID 1 da cepa de *N. meningitidis* MC58; AY548371 (AAT01290.1) (da cepa de *N. meningitidis* CU385); AY548370 (AAT01289.1) (da cepa de *N. meningitidis* H44/76); AY548377 (AAS56920.1) fHbp ID 4 da cepa de *N. meningitidis* M4105; AY548376 (AAS56919.1) (da cepa de *N. meningitidis* M1390); AY548375 (AAS56918.1) (da cepa de *N. meningitidis* NZ98/254); AY548374 (AAS56917.1) (da cepa de *N. meningitidis* M6190); AY548373 (AAS56916.1) (da cepa de *N. Meningitidis* 4243); e AY548372 (AAS56915.1) (da cepa de *N. meningitidis* BZ83).

[000131] Para propósitos de identificar sequências de aminoácidos relevantes contempladas para o uso nas fHbps em questão reveladas aqui, deveria ser observado que a fHbp imatura inclui uma sequência líder de cerca de 19 resíduos. Além disso, quando fornecida uma sequência de aminoácidos a pessoa normalmente versada pode facilmente prever as sequências de nucléico que podem codificar e prover a expressão de um polipeptídeo que tem uma tal sequência de aminoácidos.

[000132] Além das sequências de aminoácidos específicas e sequências de ácido nucleico fornecidas aqui, a revelação também contempla polipeptídeos e ácidos nucleicos que têm sequências que são pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% idênticas em sequência a tais exemplos de aminoácido e ácidos nucleicos. Os termos "idêntico" ou porcentagem de "identidade", no contexto de duas ou mais sequências de polinucleotídeo, ou duas ou mais sequências de aminoácidos, referem-se a duas ou mais sequências ou subsequências que são as mesmas ou têm uma porcentagem especificada de resíduos de aminoácido ou nucleotídeos que são os mesmos (por exemplo, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% idênticos em uma região especificada), quando comparados e alinhados para correspondência máxima em uma região designada, por exemplo, uma V_E ou uma região de pelo menos cerca de 40, 45, 50, 55, 60, 65 ou mais aminoácidos ou nucleotídeos em comprimento, e pode ser até o completo da sequência de aminoácidos ou de nucleotídeos de referência (por exemplo, uma fHbp completa). A revelação especificamente contempla polimorfismos de ocorrência natural e sequências de aminoácidos sinteticamente produzidas e seus ácidos nucléicos de codificação.

[000133] Para comparação de sequência, tipicamente uma sequência atua como uma sequência de referência (por exemplo, uma sequência de polipeptídeos de fHbp de ocorrência natural ou um segmento da mesma) à qual sequências de teste são comparadas. Quando usar um algoritmo de comparação de sequência, as sequências de teste e de referência são entradas em um programa de computação, as coordenadas de sequência são designadas, se necessário, e os parâmetros do programa de algoritmo de sequência são designados. O algoritmo de comparação de sequência depois calcula a porcentagem de identidade de sequência para a(s) sequência(s) de teste com

relação à sequência de referência, com base nos parâmetros de programa designados.

[000134] Exemplos de algoritmos que são adequados para determinar a porcentagem de identidade de sequência são os algoritmos de BLAST e BLAST 2.0, que são descritos em Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 e Altschul et al. (1977) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, respectivamente. Software para executar análises de BLAST está publicamente disponível através do National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov). Outros algoritmos exemplares incluem ClustalW (Higgins D., et al. (1994) *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680), disponíveis em www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html.

[000135] Algumas posições de resíduo que não são idênticas diferem através de substituições de aminoácido conservadoras. Substituições de aminoácido conservadoras referem-se à interpermutabilidade dos resíduos tendo cadeias laterais similares. Por exemplo, um grupo de aminoácidos tendo cadeias laterais alifáticas são glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; um grupo de aminoácidos tendo cadeias laterais alifáticas-hidroxila são serina e treonina; um grupo de aminoácidos contendo cadeias laterais de amida são asparagina e glutamina; um grupo de aminoácidos tendo cadeias laterais aromáticas são fenilalanina, tirosina, e triptofano; um grupo de aminoácidos tendo cadeias laterais acídicas são aspartato e glutamato; um grupo de aminoácidos tendo cadeias laterais básicas são lisina, arginina, e histidina; e um grupo de aminoácidos tendo cadeias laterais contendo enxofre são cisteína e metionina.

[000136] Identidade de sequência entre dois ácidos nucleicos pode também ser descrita em termos de hibridação de duas moléculas entre si sob condições rigorosas. As condições de hibridação são selecionadas seguindo os métodos padrões na técnica (vide, por exemplo,

Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edição, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.). Um exemplo de condições de hibridação rigorosas é hibridação a 50°C ou mais alta e 0,1 x SSC (15 mM de cloreto de sódio/1,5 mM de citrato de sódio). Outro exemplo de condições de hibridação rigorosas é incubação durante a noite a 42°C em uma solução: 50% de formamida, 5 x SSC (150 mM de NaCl, 15 mM de citrato de trissódio), 50 mM de fosfato de sódio (pH 7,6), solução de 5 x Denhardt, 10% de sulfato de dextrana, e 20 mg/ml de DNA de esperma de salmão sonicado desnaturado, seguido lavando os filtros em 0,1 x SSC em cerca de 65°C. Condições de hibridação rigorosas são condições de hibridação que são pelo menos tão rigorosas quanto as condições representativas acima onde é considerado que as condições são pelo menos tão rigorosas se elas fossem pelo menos cerca de 80% tão rigorosas, tipicamente pelo menos 90% tão rigorosas quanto as condições rigorosas específicas acima.

MÉTODOS DE PRODUÇÃO

[000137] As fHbps da revelação presente podem ser produzidas por qualquer método adequado, incluindo métodos recombinantes e não-recombinantes (por exemplo, síntese química). Onde a fHbp em questão for produzido usando técnicas recombinantes, os métodos usualmente podem envolver qualquer construção adequada e qualquer célula hospedeira adequada que podem ser uma célula procariótica ou eucariótica, uma célula hospedeira bacteriana ou de levedura, mais usualmente uma célula bacteriana. Métodos para introdução de material genético nas células hospedeiras incluem, por exemplo, transformação, eletroporação, conjugação, métodos de fosfato de cálcio e outros. O método para transferência pode ser selecionado para prover expressão estável do ácido nucleico de codificação de fHbp introduzido. O ácido nucleico de codificação de fHbp pode ser fornecido como um elemento episomal herdável (por exemplo, plasmídeo) ou pode

estar genomicamente integrado.

[000138] Vetores adequados para transferir ácido nucleico de codificação de fHbp podem variar em composição. Vetores integrativos podem ser plasmídeos condicionalmente replicativos ou suicidas, bacteriófagos, e outros. As construções podem incluir vários elementos, incluindo, por exemplo, promotores, marcadores genéticos selecionáveis (por exemplo, genes que conferem resistência a antibióticos (por exemplo, kanamicina, eritromicina, cloranfenicol, ou gentamicina)), origem de replicação (para promover a replicação em uma célula hospedeira, por exemplo, uma célula hospedeira bacteriana), e outros. A escolha do vetor dependerá de uma variedade de fatores tais como o tipo de célula em que a propagação é desejada e o propósito da propagação. Certos vetores são úteis para amplificar e fazer quantidades grandes da sequência de DNA desejada. Outros vetores são adequados para expressão em células em cultura. Ainda outros vetores são adequados para transferência e expressão em células em um animal inteiro. A escolha do vetor apropriado está bem dentro da habilidade da técnica. Muitos tais vetores estão comercialmente disponíveis.

[000139] Em um exemplo, o vetor é um vetor de expressão com base em plasmídeos epissomais contendo marcadores selecionáveis de resistência a fármacos e elementos que fornecem replicação autônoma em células hospedeiras diferentes (por exemplo, em *E. coli* e *N. meningitidis*). Um exemplo de um tal "vetor ponte" é o plasmídeo pFP10 (Pagotto et al. (2000) *Gene* 244:13-19).

[000140] Construções podem ser preparadas, por exemplo, inserindo um polinucleotídeo de interesse em uma cadeia principal de construção, tipicamente por meio de ligação de DNA ligase a um sítio de enzima de restrição clivado no vetor. Alternativamente, a sequência de nucleotídeos desejada pode ser inserida por recombinação homóloga ou recombinação sítio-específica. Tipicamente a recombinação homó-

loga é realizada ligando regiões de homologia ao vetor nos flaqueamentos da sequência de nucleotídeos desejada, enquanto a recombinação sítio-específica pode ser realizada através de uso de sequências que facilitam a recombinação sítio-específica (por exemplo, cre-lox, sítios att, etc.). Ácido nucleico contendo tais sequências pode ser adicionado, por exemplo, por ligação dos oligonucleotídeos, ou através de reação em cadeia da polimerase usando iniciadores compreendendo tanto a região de homologia como uma porção da sequência de nucleotídeos desejada.

[000141] Os vetores podem prover manutenção extracromossômica em uma célula hospedeira ou podem prover integração no genoma da célula hospedeira. Vetores são descritos amplamente em numerosas publicações bem conhecidas àqueles na técnica, incluindo, por exemplo, *Short Protocols in Molecular Biology*, (1999) F. Ausubel, et al., eds., Wiley & Sons. Os vetores podem fornecer expressão dos ácidos nucleicos que codificam a fHbp em questão, podem prover propagação dos ácidos nucleicos em questão, ou ambos.

[000142] Exemplos de vetores que podem ser usados incluem, mas não são limitados àqueles derivados de DNA de bacteriófago recombinante, DNA de plasmídeo ou DNA de cosmídeo. Por exemplo, vetores de plasmídeo tais como pBR322, pUC 19/18, pUC 118, 119 e a série de vetores M13 mp podem ser usados. pET21 é também um vetor de expressão que pode ser usado. Vetores de bacteriófago podem incluir λ gt10, λ gt11, λ gt18-23, λ ZAP/R e a série de vetores de bacteriófago EMBL. Outros vetores que podem ser utilizados incluem, mas não são limitados a, pJB8, pCV 103, pCV 107, pCV 108, pTM, pMCS, pNNL, pHSG274, COS202, COS203, pWE15, pWE16 e a série de vetores caromid 9.

[000143] Para expressão de uma fHbp em questão, um cassete de expressão pode ser empregado. Desse modo, a revelação presente

fornece um vetor de expressão recombinante que compreende um ácido nucleico em questão. O vetor de expressão fornece sequências reguladoras transcricionais e translacionais, e pode prover expressão induzível ou constitutiva onde a região de codificação é operavelmente ligada sob o controle transcricional da região de iniciação transcricional, e uma região de terminação transcricional e translacional. Estas regiões de controle podem ser nativas para uma fHbp da qual a fHbp em questão é derivada, ou podem ser derivadas de fontes exógenas. Em geral, as sequências reguladoras transcricionais e translacionais podem incluir, mas não se limitam a, sequências promotoras, sítios de ligação ribossômicos, sequências de começo e término transcricionais, sequências de começo e término translacionais, e sequências acentuadoras ou ativadoras. Promotores podem ser constitutivos ou induzíveis, e podem ser um promotor constitutivo forte (por exemplo, T7, e outros).

[000144] Vetores de expressão em geral têm sítios de restrição convenientes localizados próximos da sequência promotora para prover a inserção das sequências de ácido nucleico que codificam as proteínas de interesse. Uma operação de marcador selecionável no hospedeiro de expressão pode estar presente para facilitar a seleção das células contendo o vetor. Além disso, a construção de expressão pode incluir elementos adicionais. Por exemplo, o vetor de expressão pode ter um ou dois sistemas de replicação, desse modo permitindo-o ser mantido nos organismos, por exemplo em células mamíferas ou de inseto para expressão e em hospedeiro procariótico para clonagem e amplificação. Além disso, a construção de expressão pode conter um gene marcador selecionável para permitir a seleção das células hospedeiras transformadas. Genes de seleção são bem conhecidos na técnica e variarão com a célula hospedeira usada.

[000145] Deveria ser observado que as fHbps da revelação presente

podem compreender elementos adicionais, tais como uma marcação detectável, por exemplo, uma marcação radioativa, uma marcação fluorescente, uma marcação de biotina, uma marcação imunologicamente detectável (por exemplo, um marcador de HA, um marcador de polihistidina) e outros. Elementos adicionais de fHbp podem ser fornecidos para facilitar o isolamento (por exemplo, marcador de biotina, marcador imunologicamente detectável) através de vários métodos (por exemplo, captura de afinidade, etc.). A fHbp em questão pode ser opcionalmente imobilizada em um suporte através de ligação covalente ou não covalente.

[000146] Isolamento e purificação de fHbp podem ser realizados de acordo com os métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, fHbp pode ser geneticamente isolada de um lisado de células modificadas para expressar uma fHbp, ou de uma mistura de reação sintética, através de purificação por imunoafinidade que em geral envolve contatar a amostra com um anticorpo de anti-fHbp (por exemplo, um mAb de anti-fHbp, tal como um MAb de JAR 5 ou outro MAb de JAR apropriado conhecido na técnica), lavar para não-especificamente remover o material ligado, e especificamente eluir a fHbp ligada. FHbp isolada pode ser ainda purificada por diálise e outros métodos normalmente empregados nos métodos de purificação de proteína. Em um exemplo, a fHbp pode ser isolada usando métodos de cromatografia de metal quelato.

CÉLULAS HOSPEDEIRAS

[000147] Quaisquer de várias células hospedeiras adequadas podem ser usadas na produção de fHbp. Em geral, a fHbp descrita aqui pode ser expressa em procariotos ou eucariotos, usualmente bactérias, mais usualmente *E. coli* ou *Neisseria* (por exemplo, *N. meningitidis*) de acordo com as técnicas convencionais. Desse modo, a revelação presente ainda fornece uma célula hospedeira geneticamente modificada

que contém um ácido nucleico que codifica uma fHbp em questão. Células hospedeiras para a produção (incluindo produção em grande escala) de uma fHbp em questão podem ser selecionadas de qualquer de uma variedade de células hospedeiras disponíveis. Exemplos de células hospedeiras para expressão incluem aquelas de um organismo unicelular procariótico ou eucariótico, tais como bactérias (por exemplo, cepas de *Escherichia coli*), levedura (por exemplo, *S. cerevisiae*, *Pichia spp.*, e outras), e podem incluir células hospedeiras originalmente derivadas de um organismo mais alto tal como insetos, vertebrados, particularmente mamíferos, (por exemplo, CHO, HEK, e outros). Em geral, as células hospedeiras bacterianas e de levedura são de interesse particular para produção da fHbp em questão.

[000148] fHbps em questão podem ser preparados na forma substancialmente pura ou substancialmente isolada (isto é, substancialmente livre de outros polipeptídeos de *Neisseria* ou de célula hospedeira) ou forma substancialmente isolada. A fHbp em questão pode estar presente em uma composição que é enriquecida para o polipeptídeo com relação a outros componentes que possam estar presentes (por exemplo, outros polipeptídeos ou outros componentes da célula hospedeira). A fHbp em questão purificada pode ser fornecida de modo que o polipeptídeo está presente em uma composição que está substancialmente livre de outros polipeptídeos expressos, por exemplo, menos que 90%, usualmente menos que 60% e mais usualmente menos que 50% da composição são compostos de outros polipeptídeos expressos.

CÉLULAS HOSPEDEIRAS PARA PRODUÇÃO DE VESÍCULA

[000149] Onde uma fHbp em questão for para ser fornecida em uma vesícula de membrana (como debatido em mais detalhe abaixo), uma célula hospedeira de *Neisseria* é modificada para geneticamente expressar uma fHbp em questão. Quaisquer de uma variedade de cepas

de *Neisseria spp.* podem ser modificadas para produzir uma fHbp em questão, e, opcionalmente que produzem ou podem ser modificadas para produzir outros antígenos de interesse, tais como PorA, podem ser usadas nos métodos revelados aqui.

[000150] Métodos e vetores para fornecer modificação genética das cepas de *Neisseria* e expressão de um polipeptídeo desejado são conhecidos na técnica. Exemplos de vetores e métodos podem ser encontrados em WO 02/09746 e O'Dwyer et al. (2004) *Infect Immun* 72:6511-80. Promotores fortes, particularmente promotores fortes constitutivos são de interesse particular. Exemplos de promotores incluem os promotores de porA, porB, lbpB, tbpB, p110, hpuAB, lgtF, opa, p110, lst, hpuAB, e rmp.

[000151] Cepas de *Neisseria spp.* patogênica ou derivadas de *Neisseria spp.* patogênica, particularmente cepas patogênicas para seres humanos ou derivadas de cepas patogênicas ou comensais para seres humanos, são de interesse particular para o uso na produção de vesícula da membrana. Exemplos de *Neisseria spp.* incluem *N. meningitidis*, *N. flavescens*, *N. gonorrhoeae*, *N. lactamica*, *N. polysacchara*, *N. cinerea*, *N. mucosa*, *N. subflava*, *N. sicca*, *N. elongata*, e outros.

[000152] Cepas de *N. meningitidis* são de interesse particular para modificação genética para expressar as fHbps em questão e para o uso na produção de vesícula. A cepa usada para a produção de vesícula pode ser selecionada de acordo com várias características diferentes que possam ser desejadas. Por exemplo, a cepa pode ser selecionada de acordo com: um tipo de PorA desejado (um "sorossubtipo", como descrito acima), grupo capsular, sorotipo, e outros; produção de polissacarídeo capsular diminuída; e outros. Por exemplo, a cepa de produção pode produzir qualquer polipeptídeo de PorA desejado, e pode expressar um ou mais polipeptídeos de PorA (ou naturalmente

ou devido à engenharia genética). Exemplos de cepas incluem aquelas que produzem um polipeptídeo de PorA que confere um sorossubtipo de P1.7.16; P1.19.15; P1.7.1; P1.5.2; P1.22a.14; P1.14; P1.5.10; P1.7.4; P1.12.13; como também variantes de tais polipeptídeos de PorA que podem ou não reter a reatividade com os reagentes serológicos convencionais usados na sorossubtipagem. Também de interesse são polipeptídeos de PorA caracterizados de acordo com a tipagem da região variável (VR) de PorA (vide, por exemplo, Russell et al. (2004) *Emerging Infect Dis* 10:674-678; Sacchi CT et al. (1998) *Clin Diagn Lab Immunol* 5:845-55; Sacchi et al (2000) *J. Infect Dis* 182:1169-1176). Um número substancial de tipos de VR distintos foi identificado que pode ser classificado em "protótipos" da família VR1 e VR2. Uma base de dados acessível pela rede descrendo esta nomenclatura e sua relação com os esquemas de tipagem anteriores é descrita em Neisseria.org/nm/typing/pora. Alinhamentos de certos tipos de VR1 e VR2 de PorA são fornecidos em Russell et al. (2004) *Emerging Infect Dis* 10:674-678.

[000153] Alternativamente ou, além disso, a cepa de produção pode ser uma cepa deficiente de cápsula. Cepas deficientes de cápsula podem fornecer vacinas com base em vesícula que fornecem um risco reduzido de suscitar uma resposta de autoanticorpo significativa em um sujeito a quem é administrada a vacina (por exemplo, devido à produção de anticorpos que reagem cruzado com ácido siálico nas superfícies das células hospedeiras). "Deficiente em cápsula" ou "deficiente em polissacarídeo capsular" como aqui usados referem-se a um nível de polissacarídeo capsular na superfície bacteriana que é inferior à de uma cepa de ocorrência natural ou, onde a cepa for geneticamente modificada, é inferior à de uma cepa parental da qual a cepa deficiente de cápsula é derivada. Uma cepa deficiente cápsula inclui cepas que são diminuídas na produção de polissacarídeo capsular de super-

fície em pelo menos 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90% ou mais, e inclui cepas em que polissacarídeo capsular não é detectável na superfície bacteriana (por exemplo, através de ensaio imunoabsorvente ligado à enzima de célula inteira (ELISA) usando um anticorpo de polissacarídeo anticapsular).

[000154] Cepas deficientes em cápsula incluem aquelas que são deficientes de cápsula devido a uma modificação genética de ocorrência natural ou recombinantemente gerada. Cepas deficientes de cápsula de ocorrência natural (vide, por exemplo, Dolan-Livengood et al. (2003) *J. Infect. Dis.* 187:1616-28), como também métodos de identificar e/ou gerar cepas deficientes de cápsula (vide, por exemplo, Fisseha et al. (2005) *Infect. Immun.* 73:4070-4080; Stephens et al. (1991) *Infect Immun* 59:4097-102; Frosch et al. (1990) *Mol Microbiol.* 4:1215-1218) são conhecidos na técnica.

[000155] Modificação de uma célula hospedeira de *Neisseria* para fornecer produção diminuída de polissacarídeo capsular pode incluir modificação de um ou mais genes envolvidos na síntese de cápsula, onde a modificação fornece, por exemplo, níveis diminuídos de polissacarídeo capsular com relação a uma célula-pai antes da modificação. Tais modificações genéticas podem incluir alterações nas sequências nucleotídeos e/ou de aminoácidos em um ou mais genes da biossíntese de cápsula tornando a cepa deficiente em cápsula (por exemplo, devido a uma ou mais inserções, deleções, substituições, e outros em um ou mais genes da biossíntese de cápsula). Cepas deficientes em cápsula podem ser desprovidas ou ser não funcionais para um ou mais genes de cápsula.

[000156] De interesse particular são as cepas que são deficientes na biossíntese de ácido siálico. Tais cepas podem fornecer produção de vesículas que reduziram o risco de suscitar anticorpos de antiácido siálico que reagem cruzado com os antígenos de ácido siálico huma-

nos, e podem ainda fornecer segurança de fabricação melhorada. Cepas que têm um defeito na biossíntese de ácido siálico (devido a uma modificação de ocorrência natural ou uma modificação engenheirada) podem ser defeituosas em quaisquer de vários genes diferentes na via biossintética de ácido siálico. De interesse particular são as cepas que são defeituosas em um produto gênico codificado pelo gene de N-acetilglucosamina-6-fosfato 2-epimerase (conhecido como synX AAF40537.1 ou siaA AAA20475), com cepas tendo este gene inativado sendo de interesse especial. Por exemplo, em uma modalidade, uma cepa deficiente em cápsula é gerada rompendo a produção de um produto gênico synX funcional (vide, por exemplo, Swartley et al. (1994) *J Bacteriol.* 176:1530-4).

[000157] Cepas deficientes em cápsula podem também ser geradas de cepas de ocorrência natural usando técnicas não recombinantes, por exemplo, pelo uso de anticorpos anticapsulares bactericidas para selecionar cepas com níveis reduzidos de polissacarídeo capsular.

[000158] Onde a revelação envolver o uso de duas ou mais cepas (por exemplo, para produzir composições antigênicas contendo umas vesículas de apresentação de fHbp em questão a partir de cepas diferentes), as cepas podem ser selecionadas para diferir em uma ou mais características da cepa, por exemplo, para fornecer vesículas que diferem na fHbp em questão usada, PorA, e outros.

PREPARAÇÃO DAS VESÍCULAS

[000159] As composições antigênicas contempladas pela revelação presente em geral incluem vesículas preparadas de células de *Neisseria* que expressam uma fHbp em questão. Como referido aqui, "vesículas" são significadas abranger vesículas de membrana externa como também microvesículas (que são também referidas como bolhas ("*blebs*")).

[000160] A composição antigênica pode conter vesículas de mem-

brana externa (OMV) preparadas da membrana externa de uma cepa cultivada de *Neisseria meningitidis* spp. geneticamente modificada para expressar uma fHbp em questão. OMVs podem ser obtidas de *Neisseria meningitidis* crescidas em meio de cultura ou cultura de meio de sólido, preferivelmente separando as células bacterianas do meio de cultura (por exemplo, através de filtração ou por uma centrifugação de velocidade baixa que empelota as células, ou outros), lisando as células (por exemplo, por adição de detergente, choque osmótico, sonicação, cavitação, homogeneização, ou outros) e separando uma fração de membrana externa de moléculas citoplásmicas (por exemplo, através de filtração; ou por precipitação diferencial ou agregação das membranas e/ou vesículas externas de membrana externa, ou através de métodos de separação de afinidade usando ligantes que especificamente reconhecem as moléculas de membrana externa; ou por uma centrifugação de velocidade alta que empelota as membranas externas e/ou vesículas de membrana externa, ou outros); as frações de membrana externa podem ser usadas para produzir OMVs.

[000161] A composição antigênica pode conter microvesículas (MV) (ou "bolhas") contendo as fHbps em questão onde a MV ou bolhas são geneticamente liberadas durante a cultura de uma cepa de *Neisseria meningitidis* modificada para expressar uma fHbp em questão. Por exemplo, as MVs podem ser obtidas cultivando uma cepa de *Neisseria meningitidis* em meio de cultura, separando as células inteiras do meio de cultura (por exemplo, através de filtração, ou por uma centrifugação de velocidade baixa que empelota apenas as células e não as bolhas menores, ou outros), e depois colecionando as MVs que estão presentes no meio de cultura livre de células (por exemplo, por filtração, precipitação diferencial ou agregação de MVs, ou por uma centrifugação de velocidade alta que empelota as bolhas, ou outros). Cepas para o uso na produção de MVs podem ser em geral selecionadas com base

na quantidade de bolhas produzidas na cultura (por exemplo, as bactérias podem ser cultivadas em um número razoável para fornecer produção de bolhas adequada para isolamento e administração nos métodos descritos aqui). Uma cepa exemplar que produz níveis altos de bolhas é descrita na Publicação do PCT No. WO 01/34642. Além da produção de bolhas, as cepas para o uso na produção de MV podem ser também selecionadas com base na produção de NspA, onde as cepas que produzem níveis mais altos de NspA podem ser de interesse particular (para exemplos de cepas de *N. meningitidis* tendo níveis de produção de NspA diferentes, vide, por exemplo, Moe et al. (1999 *Infect. Immun.* 67: 5664). Outras cepas de interesse para o uso na produção de bolhas incluem cepas tendo um gene de GNA33 inativado que codifica uma lipoproteína requerida para a separação de célula, arquitetura de membrana e virulência (vide, por exemplo, Adu-Bobie et al. (2004) *Infect Immun.* 72:1914-1919).

[000162] As composições antigênicas da revelação presente podem conter vesículas de uma cepa, ou de 2, 3, 4, 5 ou mais cepas cujas cepas podem ser homólogas ou heterólogas, usualmente heterólogas, entre si. Por exemplo, as cepas podem ser homólogas ou heterólogas com respeito a PorA e/ou a fHbp da qual a fHbp em questão é derivada. As vesículas podem ser preparadas de cepas que expressam mais de uma fHbp em questão (por exemplo, 1, 2, 3, ou mais fHbp em questão) que pode ser composta de sequências de aminoácidos de fHbp de variantes diferentes (v.1, v.2, ou v.3) ou subvariantes (por exemplo, uma subvariante v.1, v.2, ou v.3).

[000163] As composições antigênicas podem compreender uma mistura de OMVs e MVs apresentando as mesmas fHbps em questão ou diferentes, onde a fHbps em questão podem opcionalmente apresentar epítomos de combinações diferentes de variantes de fHbp e/ou subvariantes e onde o OMVs e/ou MVs pode ser das mesmas ou diferentes

cepas. Vesículas podem ser administradas de cepas diferentes como uma mistura, ou podem ser administradas serialmente.

[000164] Onde desejado (por exemplo, onde as cepas usadas para produzir as vesículas estiverem associadas com endotoxina ou níveis altos particulares de endotoxina), as vesículas são opcionalmente tratadas para reduzir endotoxina, por exemplo, reduzir toxicidade seguindo a administração. Embora menos desejável como debatido abaixo, a redução da endotoxina pode ser realizada através de extração com um detergente adequado (por exemplo, BRIJ-96, deoxicolato de sódio, lauroilsarcosinato de sódio, Empigen BB, Triton X-100, TWEEN 20 (polioxietileno de monolaurato de sorbitan), TWEEN 80, em uma concentração de 0,1-10%, preferivelmente 0,5-2%, e SDS). Onde extração de detergente for usada, é preferível usar um detergente diferente de deoxicolato.

[000165] As vesículas das composições antigênicas podem ser preparadas sem detergente, por exemplo, sem uso de deoxicolato. Embora o tratamento de detergente seja útil para remover a atividade da endotoxina, ela pode ser desprovida da lipoproteína de fHbp nativa e/ou fHbp em questão (incluindo a fHbp lipidada) por extração durante a produção da vesícula. Desse modo, pode ser particularmente desejável diminuir a atividade da endotoxina usando tecnologia que não requer um detergente. Em uma abordagem, as cepas que são produtores de endotoxina relativamente baixos (lipopolissacarídeo, LPS) são usadas para evitar a necessidade de remover a endotoxina da preparação final antes do uso em seres humanos. Por exemplo, as vesículas podem ser preparadas de mutantes de *Neisseria* em que o lipooligosacarídeo ou outros antígenos que possam ser indesejáveis em uma vacina (por exemplo, Rmp) é está reduzido ou eliminado.

[000166] Vesículas podem ser preparadas de cepas de *N. meningitidis* contendo modificações genéticas que resultam em atividade tóxica

detectável diminuída ou nenhuma do lipídio A. Por exemplo, tal cepa pode ser geneticamente modificada em biossíntese de lipídio A (Steeghs et al. (1999) *Infect Immun* 67:4988-93; van der Ley et al. (2001) *Infect Immun* 69:5981-90; Steeghs et al. (2004) *J Endotoxin Res* 10:113-9; Fissaha et al, (2005) *Infect Immun* 73:4070). As composições imunogênicas podem ser desintoxicadas por modificação de LPS, tal como infrarregulação e/ou inativação das enzimas codificadas por *lpxL1* ou *lpxL2*, respectivamente. Produção de um lipídio penta-acilado A feito em mutantes de *lpxL1* indica que a enzima codificada por *lpxL1* acrescenta o C12 ao 3-OH C14 ligado a N na posição 2' de GlcN II. A espécie de lipídio principal A encontrada em mutantes de *lpxL2* é tetra-acilado, indicando que a enzima codificada por *lpxL2* adiciona o outro C12, isto é, ao 3-OH C14 ligado a N na 2 posição de GlcN I. Mutações que resultam em uma expressão diminuída (ou nenhuma) destes genes (ou atividade diminuída ou nenhuma dos produtos destes genes) resultam em atividade tóxica alterada de lipídio A (van der Ley et al. (2001) *Infect Immun* 69:5981-90). Lipídio A tetra-acilado (mutante *lpxL2*) e penta-acilado (mutante *lpxL1*) é menos tóxico que o lipídio A do tipo selvagem. Mutações no gene de codificação de 4'-cinase do lipídio A (*lpxK*) também diminui a atividade tóxica do lipídio A. De interesse particular para o uso na produção de vesículas (por exemplo, MV ou OMV) são cepas de *N. meningitidis* geneticamente modificadas para fornecer para proteína codificada por *LpxL1* funcional detectável diminuída ou nenhuma, por exemplo, onde a bactéria de *Neisseria* (por exemplo, cepa de *N. meningitidis*) for modificada para fornecer atividade geneticamente diminuída ou nenhuma de um produto gênico do gene *lpxL1*. Por exemplo, a bactéria de *Neisseria* pode ser modificada para ter um silenciamento genético do gene *lpxL1*, por exemplo, onde o gene *lpxL1* for rompido. Vide, por exemplo, Publicação de Patente US No. 2009/0035328. A bactéria de *Neisseria*

pode ser geneticamente modificada para fornecer atividade diminuída ou nenhuma de um produto gênico do gene *lpxL2*. A bactéria de *Neisseria* pode ser geneticamente modificada para fornecer atividade diminuída ou nenhuma de um produto gênico do gene *lpxL1* e do gene *lpxL2*. Tais vesículas fornecem toxicidade reduzida quando comparadas às cepas de *N. meningitidis* que são do tipo selvagem para a produção de LPS, ao mesmo tempo retendo a imunogenicidade de fHbp em questão.

[000167] Atividade tóxica de LPS pode também ser alterada introduzindo mutações em genes/loci envolvidos na resistência de polimixina B (tal resistência foi correlatada com a adição de aminoarabinose no 4' fosfato de lipídio A). Estes genes/loci poderiam ser *pmrE* que codifica uma UDP-glicose desidrogenase, ou uma região dos genes de resistência a peptídeos antimicrobianos comum a muitas enterobacteriaceae que poderiam estar envolvidas na síntese e transferência de aminoarabinose. O gene *pmrF* que está presente nesta região codifica uma dolicol-fosfato manosil transferase (Gunn J. S., Kheng, B. L., Krueger J., Kim K., Guo L., Hackett M., Miller S. I. 1998. *Mol. Microbiol.* 27: 1171-1182).

[000168] Mutações no sistema regulador de PhoP-PhoQ que é um sistema regulador de dois componentes de fosfo-transmissão (por exemplo, fenótipo constitutivo de PhoP, PhoPc), ou condições ambientais ou culturais de Mg⁺⁺ baixo (que ativam o sistema regulador de PhoP-PhoQ) levam à adição de aminoarabinose no 4'-fosfato e miristato de substituição de 2-hidroxi-miristato (hidroxilação de miristato). Este lipídio A modificado exibe habilidade reduzida para estimular a expressão de E-selectina por células endoteliais humanas e secreção de TNF de monócitos humanos.

[000169] Cepas resistentes à polimixina B são também adequadas para o uso, visto que tais cepas foram mostradas ter toxicidade redu-

zida de LPS (vide, por exemplo, van der Ley et al. (1994) em: *Proceedings of the ninth international pathogenic Neisseria conference*. The Guildhall, Winchester, Inglaterra). Alternativamente, peptídeos sintéticos que imitam a atividade de ligação da polimixina B podem ser acrescentados às composições antigênicas para reduzir a atividade tóxica de LPS (vide, por exemplo, Rustici et al. (1993) *Science* 259:361-365; Porro et al. (1998) *Prog Clin Biol Res.* 397:315-25).

[000170] Endotoxina pode também ser reduzida mediante seleção das condições da cultura. Por exemplo, cultivando a cepa em um meio de crescimento contendo 0,1 mg-100 mg de aminoarabinose por litro de meio fornece toxicidade de lipídio reduzida (vide, por exemplo, WO 02/097646).

COMPOSIÇÕES E FORMULAÇÕES

[000171] "Composições", "composição de antígeno", "composição antigênica" ou "composição imunogênica" são aqui usadas como um assunto de conveniência para referir-se genericamente às composições compreendendo uma fHbp em questão como revelada aqui cuja fHbp em questão pode ser opcionalmente conjugada para ainda intensificar a imunogenicidade. Composições úteis para suscitar anticorpos, por exemplo, anticorpos contra *Neisseria meningitidis*, por exemplo, anticorpos bactericidas para *Neisseria meningitidis*, em um ser humano são especificamente contempladas pela revelação presente. Composições antigênicas podem conter 1, 2, ou mais fHbps em questão diferentes. Onde houver mais de um tipo de fHbp, cada fHbp em questão pode apresentar epítomos de combinações diferentes das variantes e/ou subvariantes de fHbp.

[000172] As composições antigênicas contêm uma quantidade imunologicamente efetiva de uma fHbp em questão, e podem ainda incluir outros componentes compatíveis, conforme necessário. As composições da revelação presente podem conter fHbp que são aglutinantes

de fH baixos. Aglutinantes de fH baixos nas composições em questão abrangem qualquer fHbp descrito acima, tal como fHbp de ocorrência não-natural ou de ocorrência natural (por exemplo, fHbp ID 14 e/ou fHbp ID 15). A composição contém uma ou mais fHbps em que pelo menos uma fHbp é um aglutinante de fH baixo. Onde houver mais de uma fHbp em uma composição, cada fHbp pode ser diferente (por exemplo, em sequências de aminoácidos e/ou conjugação).

[000173] Composições imunogênicas contempladas pela revelação presente incluem, mas não são limitadas a, composições compreendendo:

1) uma fHbp de ocorrência não natural (por exemplo, uma fHbp de ocorrência não-natural que tem afinidade inferior por fH humano que a fHbp ID 1); e

2) uma fHbp (por exemplo, uma fHbp de ocorrência não-natural, por exemplo, uma fHbp de ocorrência não-natural que tem uma afinidade inferior por fH que a fHbp ID 1) e NspA;

onde a fHbp e/ou NspA podem ser fornecidas como proteínas recombinantes e/ou em uma composição baseada em vesícula (por exemplo, OMV). Deveria ser observado que onde a composição incluir NspA e uma fHbp, a atividade bactericida dos anticorpos suscitada por administração da composição pode ser o resultado da cooperação dos anticorpos a um ou ambos antígenos. Exemplos de composições imunogênicas fornecidas pela revelação presente incluem:

a) uma composição imunogênica que compreende uma variante de fHbp de ocorrência não-natural como descrita acima (por exemplo, uma, onde a fHbp de ocorrência não-natural suscita uma resposta de anticorpo bactericida para pelo menos uma cepa de *Neisseria meningitidis*);

b) uma composição imunogênica que compreende uma variante de fHbp de ocorrência não-natural como descrita acima (por exem-

plo, uma fHbp de ocorrência não-natural que tem afinidade inferior por fH humano que a fHbp ID 1); e uma proteína de NspA recombinante;

c) uma composição imunogênica que compreende uma fHbp isolada que compreende pelo menos 85% de identidade de sequência de aminoácidos para fHbp ID 14 ou fHbp ID 15, onde a fHbp tem afinidade inferior por fator humano H (fH) que a fHbp ID 1;

d) uma composição imunogênica que compreende uma fHbp isolada que compreende pelo menos 85% de identidade de sequência de aminoácidos para fHbp ID 14 ou fHbp ID 15, onde a fHbp tem afinidade inferior por fator humano H (fH) que a fHbp ID 1; e uma proteína de NspA recombinante;

e) uma composição imunogênica que compreende uma OMV nativa obtida de uma célula hospedeira de *Neisseria* geneticamente modificada que é modificada geneticamente com um ácido nucleico que codifica uma variante de fHbp de ocorrência não-natural como descrita acima (por exemplo, uma fHbp de ocorrência não-natural que tem afinidade inferior por fH humano que a fHbp ID 1), de modo que a fHbp de ocorrência não-natural codificada é produzida pela célula hospedeira geneticamente modificada onde a OMV compreende a fHbp de ocorrência não-natural codificada; e

f) uma composição imunogênica que compreende uma OMV nativa obtida de uma célula hospedeira de *Neisseria* geneticamente modificada que é modificada geneticamente com um ácido nucleico que codifica uma variante de fHbp de ocorrência não-natural como descrita acima (por exemplo, uma fHbp de ocorrência não-natural que tem afinidade inferior por fH humano que a fHbp ID 1, de modo que a fHbp de ocorrência não-natural codificada é produzida pela célula hospedeira geneticamente modificada onde a OMV compreende a fHbp de ocorrência não-natural codificada; e onde a célula hospedeira de *Neisseria* também produz níveis mais altos de NspA, de

modo que a OMV também compreende NspA. Por exemplo, a célula hospedeira de *Neisseria* pode ser uma que é geneticamente modificada para expressão aumentada de NspA.

[000174] Por "quantidade imunologicamente efetiva" é significado que a administração daquela quantidade a um indivíduo, ou em uma dose única, como parte de uma série das mesmas composições antigênicas ou diferentes, é efetiva para suscitar uma resposta de anticorpo efetivo para o tratamento ou prevenção de um sintoma ou doença causada, por exemplo, por infecção por *Neisseria*, particularmente *N. meningitidis*, mais particularmente *N. Meningitidis* do Grupo B. Esta quantidade varia, dependendo da saúde e condição física do indivíduo a ser tratado, idade, a capacidade do sistema imune do indivíduo para produzir os anticorpos, o grau de proteção desejado, a formulação da vacina, a avaliação da situação médica pelo clínico responsável pelo tratamento, e outros fatores relevantes. Espera-se que a quantidade cairá em uma faixa relativamente vasta que pode ser determinada através de experimentações rotineiras.

[000175] Sequências de aminoácidos de polipeptídeos de NspA são conhecidas na técnica. Vide, por exemplo, WO 96/29412; e Martin et al. (1997) *J. Exp. Med.* 185:1173; Acesso do GenBank No. U52066; e Acesso do GenBank No. AAD53286. Um "polipeptídeo de NspA" pode compreender uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99%, ou 100%, de identidade de sequência de aminoácidos para uma extensão contígua de cerca de 75 aminoácidos a cerca de 100 aminoácidos, de cerca de 100 aminoácidos a cerca de 150 aminoácidos ou de cerca de 150 aminoácidos a cerca de 174 aminoácidos, da sequência de aminoácidos descrita na Figura 44. Um "polipeptídeo de NspA" pode compreender uma sequência de aminoácidos que tem pelo me-

nos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99%, ou 100%, de identidade de sequência de aminoácidos para uma extensão contígua de cerca de 75 aminoácidos a cerca de 100 aminoácidos, ou de cerca de 100 aminoácidos a cerca de 155 aminoácidos, dos aminoácidos 20 a 174 da sequência de aminoácidos descrita na Figura 44. Em alguns casos, o polipeptídeo de NspA carece de uma sequência sinal; em outros casos (por exemplo, para expressão em uma célula hospedeira), o polipeptídeo de NspA inclui uma sequência de sinal.

[000176] Regime de dosagem pode ser um esquema de dose única ou um esquema de doses múltiplas (por exemplo, incluindo injeções auxiliares) com uma forma de dosagem de unidade da composição antigênica administrada em tempos diferentes. O termo "forma de dosagem de unidade", como aqui usado, refere-se às unidades fisicamente distintas adequadas como dosagens unitárias para os sujeitos humanos e animais, cada unidade contendo uma quantidade predefinida das composições antigênicas da revelação presentes em uma quantidade suficiente para produzir o efeito desejado, cujas composições são fornecidas em associação com um excipiente farmacologicamente aceitável (por exemplo, diluente, carreador ou veículo farmacologicamente aceitável). A composição antigênica pode ser administrada junto com outros agentes imunorreguladores.

[000177] As composições antigênicas podem ser fornecidas em um excipiente farmacologicamente aceitável que pode ser uma solução tal como uma solução aquosa estéril, frequentemente uma solução salina, ou elas podem ser fornecidas em forma de pó. Tais excipientes podem ser substancialmente inertes, se desejado.

[000178] Em algumas modalidades, uma composição imunogênica em questão compreende uma fHbp em questão presente em uma ve-

sícula. Em algumas modalidades, uma composição imunogênica em questão compreende uma fHbp em questão presente em uma MV. Em algumas modalidades, uma composição imunogênica em questão compreende uma fHbp em questão presente em uma OMV. Em algumas modalidades, uma composição imunogênica em questão compreende uma mistura de MV e OMV compreendendo uma fHbp em questão. As vesículas, tais como MV e OMV, são descritas acima.

[000179] As composições antigênicas podem ainda conter um adjuvante. Exemplos de adjuvantes adequados conhecidos que podem ser usados em seres humanos incluem, mas necessariamente não se limitam a, alume, fosfato de alumínio, hidróxido de alumínio, MF59 (4,3% p/v de esqualeno, 0,5% p/v de Tween 80™, 0,5% p/v de Span 85), ácido nucléico contendo CpG (onde a citosina é não-metilada), QS21, MPL, 3DMPL, extrato de Aquilla, ISCOMS, mutantes de LT/CT, micropartículas de poli(D,L-lactide-co-glicolídeo) (PLG), Quil A, interleucinas, e outros. Para animais experimentais, pode-se usar Freund, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nemuramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, referida como nem-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforilóxi)-etilamina (CGP 19835A, referido como MTP-PE), e RIBI, que contém três componentes extraídos de bactérias, lipídio A de monofosforila, dimicolato de trealose e esqueleto da parede celular (MPL+TDM+CWS) em uma emulsão de 2% de esqualeno/Tween 80. A efetividade de um adjuvante pode ser determinada medindo a quantidade de anticorpos direcionados contra o antígeno imunogênico ou epítipo antigênico dos mesmos.

[000180] Outros adjuvantes exemplares para intensificar a efetividade da composição incluem, mas não são limitados a: (1) formulações de emulsão de óleo-em-água (com ou sem outros agentes imunoestimulantes específicos tais como peptídeos de muramila (vide abaixo)

ou componentes da parede de células bacterianas), tais como, por exemplo, (a) MF59TM (WO 90/14837; Capítulo 10 em *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*, eds. Powell & Newman, Plenum Press 1995), contendo 5% de Squalene, 0,5% de Tween 80, e 0,5% de Span 85 (opcionalmente contendo MTP-PE) formulado em partículas de submicron usando um microfluidizador, (b) SAF, contendo 10% de Squalene, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero bloqueado plurônico L121, e thr-MDP ou microfluidizado em uma emulsão de submicron ou submetido a vórtice para gerar uma emulsão de tamanho de partícula maior, e (c) sistema de adjuvante de RIBI TM (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, Mont.) contendo 2% de Squalene, 0,2% de Tween 80, e um ou mais componentes da parede das células bacterianas tais como monofosforilipídio A (MPL), dimicolato de trealose (TDM), e esqueleto da parede celular (CWS), preferivelmente MPL+CWS (Detox TM); (2) adjuvantes de saponina, tais como QS21 ou StimulonTM (Cambridge Bioscience, Worcester, Massa.) podem ser usados ou partículas geradas dos mesmos tais como ISCOMs (complexos imunoes timulantes) cujos ISCOMS podem ser destituídos de detergente adicional por exemplo WO 00/07621; (3) Adjuvante de Freund Completo (CFA) e o Adjuvante de Freund Incompleto (IFA); (4) citocinas, tais como interleucinas (por exemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (WO99/44636), etc.), interferonas (por exemplo, interferona gama), fator estimulante da colônia de macrófagos (M-CSF), fator de necrose tumoral (TNF), etc.; (5) lipídio de monofosforila A (MPL) ou MPL 3-O-desacilado (3dMPL) por exemplo GB-2220221, EP-A-0689454, opcionalmente na ausência substancial de alume quando usado com sacarídeos pneumocócicos por exemplo WO 00/56358; (6) combinações de 3dMPL com, por exemplo, QS21 e/ou emulsões de óleo-em-água por exemplo EP-A-0835318, EP-A-0735898, EP-A-0761231; (7) oligonucleotídeos compreendendo motivos CpG (Krieg Vaccine 2000, 19,

618-622; Krieg *Curr Opin Mol Ther* 2001 3:15-24; Roman et al., *Nat. Med.*, 1997, 3, 849-854; Weiner et al., *PNAS USA*, 1997, 94, 10833-10837; Davis et al, *J. Immunol*, 1998, 160, 810-876; Chu et al., *J. Exp. Med.*, 1997, 186, 1623-1631; Lipford et al, *Ear. J. Immunol.*, 1997, 27, 2340-2344; Moldoveanu et al., *Vaccine*, 1988, 16, 1216-1224, Krieg et al., *Nature*, 1995, 374, 546-549; Klinman et al., *PNAS USA*, 1996, 93, 2879-2883; Ballas et al, *J. Immunol*, 1996, 157, 1840-1845; Cowdery et al, *J. Immunol*, 1996, 156, 4570-4575; Halpern et al, *Cell Immunol*, 1996, 167, 72-78; Yamamoto et al, *Jpn. J. Cancer Res.*, 1988, 79, 866-873; Stacey et al, *J. Immunol.*, 1996, 157, 2116-2122; Messina et al, *J. Immunol*, 1991, 147, 1759-1764; Yi et al, *J. Immunol*, 1996, 157, 4918-4925; Yi et al, *J. Immunol*, 1996, 157, 5394-5402; Yi et al, *J. Immunol*, 1998, 160, 4755-4761; e Yi et al, *J. Immunol*, 1998, 160, 5898-5906; pedidos de patente internacionais WO 96/02555, WO 98/16247, WO 98/18810, WO 98/40100, WO 98/55495, WO 98/37919 e WO 98/52581, isto é, contendo pelo menos um dinucleotídeo de CG, onde a citosina é não-metilada; (8) um éter de polioxietileno ou um éster de polioxietileno, por exemplo, WO 99/52549; (9) um tensoativo de éster de sorbitan de polioxietileno em combinação com um octoxinol (WO 01/21207) ou um éter de alquila de polioxietileno ou tensoativo de éster em combinação com pelo menos um tensoativo não-iônico adicional tal como um octoxinol (WO 01/21152); (10) uma saponina e um oligonucleotídeo imunoestimulante (por exemplo, um oligonucleotídeo de CpG) (WO 00/62800); (11) um imunoestimulante e uma partícula de sal de metal por exemplo WO 00/23105; (12) uma saponina e uma emulsão de óleo-em-água por exemplo WO 99/11241; (13) uma saponina (por exemplo, QS21)+3dMPL+IM2 (opcionalmente + um estero) por exemplo WO 98/57659; (14) outras substâncias que atuam como agentes imunoestimulantes para intensificar a eficácia da composição. Peptídeos de muramila incluem N-acetil-muramil-L-treonil-D-

isoglutamina (thr-MDP), N-25 acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nem-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutarninil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforilóxi)-etilamina MTP-PE), etc. Adjuvantes adequados para administração a um ser humano são de interesse particular.

[000181] As composições de antígeno podem conter outros componentes, tais como tipos farmacêuticos de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina de sódio, talco, celulose, glicose, sacarose, magnésio, carbonato, e outros. As composições podem conter substâncias auxiliares farmacêuticamente aceitáveis como requerido para aproximar às condições fisiológicas tais como agentes de ajuste de pH e tamponantes, agentes de ajuste de toxicidade e outros, por exemplo, acetato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, lactato de sódio e outros.

[000182] A concentração da fHbp em questão em uma formulação pode variar amplamente (por exemplo, de menos que cerca de 0,1%, usualmente a ou pelo menos cerca de 2% até de 20% a 50% ou mais em peso) e usualmente será selecionada primariamente com base em volumes fluidos, viscosidades, e fatores baseados no paciente de acordo com o modo particular de administração selecionado e as necessidades do paciente.

[000183] As formulações contendo fHbp podem ser fornecidas na forma de uma solução, suspensão, tablete, pílula, cápsula, pó, gel, creme, loção, unguento, aerossol ou outros. É reconhecido que a administração oral pode requerer proteção das composições de digestão. Isto é tipicamente realizado por associação da composição com um agente que o torna resistente à hidrólise acídica e enzimática ou acondicionamento da composição em um veículo apropriadamente resistente. Meios de proteger da digestão são bem conhecidos na técnica.

[000184] As formulações contendo fHbp podem também ser forneci-

das para intensificar a meia-vida em soro de fHbp seguindo administração. Por exemplo, onde as fHbps isoladas forem formuladas para injeção, a fHbp pode ser fornecida em uma formulação de lipossoma, preparada como um colóide, ou outras técnicas convencionais para estender a meia-vida em soro. Uma variedade dos métodos está disponível para preparar os lipossomas, como descrito, por exemplo, em Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980), Patentes U.S 4.235.871, 4.501.728 e 4.837.028. As preparações podem também ser fornecidas em formas de liberação controlada ou de liberação lenta.

IMUNIZAÇÃO

[000185] A revelação presente fornece um método de induzir uma resposta imune para pelo menos uma cepa de *Neisseria* em um hospedeiro mamífero. Os métodos em geral envolvem administrar a um indivíduo em necessidade do mesmo uma quantidade efetiva de uma composição imunogênica em questão.

[000186] As composições antigênicas contendo fHbp são em geral administradas a um sujeito humano que está em risco de adquirir uma doença de *Neisseria* para impedir ou pelo menos parcialmente deter o desenvolvimento da doença e suas complicações. Uma quantidade adequada para realizar isso é definida como uma "dose terapêuticamente efetiva". Quantidades efetivas para o uso terapêutico dependerão, por exemplo, da composição antigênica, da maneira de administração, do peso e estado geral de saúde do paciente, e do julgamento do médico prescrevente. Doses únicas ou múltiplas das composições antigênicas podem ser administradas dependendo da dosagem e frequência requeridas e toleradas pelo paciente, e da rota de administração.

[000187] As composições antigênicas contendo fHbp são em geral administradas em uma quantidade efetiva para suscitar uma resposta imune, particularmente uma resposta imune humoral, por exemplo,

uma resposta de anticorpo bactericida, no hospedeiro. Como observado acima, as quantidades para imunização variarão, e podem em geral variar de cerca de 1 µg a 100 µg para paciente de 70 kg, usualmente 5 µg a 50 µg/70 kg. Dosagens substancialmente mais altas (por exemplo, 10 mg a 100 mg ou mais) podem ser adequadas nas rotas de administração oral, nasal, ou tópica. A administração inicial pode ser seguida por imunização de reforço da mesma da composição antigênica contendo fHbp diferente. Usualmente, a vacinação envolve pelo menos um reforço, mais usualmente dois reforços.

[000188] Em geral, a imunização pode ser realizada por administração por qualquer rota adequada, incluindo administração da composição oral, nasal, nasofaríngea, parenteral, entérica, gástrica, tópica, transdérmica, subcutânea, intramuscularmente, em forma de tablete, sólido, em pó, líquido, aerossol, local ou sistemicamente, com ou sem excipientes adicionados. Métodos atuais serão conhecidos para preparar as composições parenteralmente administráveis ou evidentes àqueles versados na técnica e são descritos em mais detalhes em tais publicações como Remington's Pharmaceutical Science, 15^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980).

[000189] Uma resposta imune anti-fHbp pode ser avaliada por meio de métodos conhecidos (por exemplo, obtendo soro do indivíduo antes e após a imunização inicial, e demonstrando uma alteração no estado imune do indivíduo, por exemplo, um ensaio de imunoprecipitação, ou um ELISA, ou um ensaio bactericida, ou um western blot, ou ensaio citométrico de fluxo, ou outros).

[000190] As composições antigênicas podem ser administradas a um sujeito humano que é imunologicamente virgem com respeito a *Neisseria meningitidis*. Em uma modalidade particular, o sujeito é uma criança de cerca de cinco anos ou mais jovem, e preferivelmente cerca de dois anos de idade ou mais nova, e as composições antigênicas

são administradas em qualquer um ou mais dos tempos seguintes: duas semanas, um mês, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ou 11 meses, ou um ano ou 15, 18, ou 21 meses após o nascimento, ou em 2, 3, 4, ou 5 anos de idade.

[000191] Pode ser em geral desejável iniciar a imunização antes do primeiro sinal dos sintomas da doença, ou ao primeiro sinal de possível ou real exposição à infecção ou doença (por exemplo, devido à exposição ou infecção por *Neisseria*).

MÉTODOS DE TRIAGEM

[000192] Em um exemplo, um método de avaliar a eficácia de uma fHbp em questão em uma composição de vacina envolve: (a) imunizar um animal hospedeiro (por exemplo, um animal hospedeiro mamífero não humano, tal como um roedor, por exemplo, um camundongo) com uma composição que compreende uma fHbp da revelação presente; e (b) medir os níveis de anticorpos bactericidas no hospedeiro. O método em questão pode também incluir avaliando a suscetibilidade de um animal hospedeiro administrado com uma vacina que compreende uma fHbp em questão a um patógeno bacteriano.

[000193] Em outro exemplo, o método pode envolver fazer e identificar anticorpos suscitados pela fHbp em questão. O método envolve isolar os anticorpos do animal hospedeiro que tem afinidade de ligação por fHbp, contatar uma célula bacteriana com os anticorpos isolados; e avaliar a ligação do anticorpo à célula bacteriana. Etapas adicionais podem incluir avaliar a ligação competitiva do anticorpo a fHbp com fator humano H; avaliar a atividade bactericida contra um patógeno bacteriano quando o anticorpo for administrado a um animal contraído com o patógeno bacteriano. Em algumas modalidades, o anticorpo está em uma população de anticorpo, e o método pode ainda compreender: isolar um ou mais anticorpos da população de anticorpo que liga à célula bacteriana. Um aspecto característico é anticorpo isolado que é

bactericida contra a célula bacteriana que pode incluir, por exemplo, atividade bactericida mediada por complemento e/ou atividade opsonofagocítica capaz de diminuir a viabilidade das bactérias em sangue humano.

[000194] Patógenos bacterianos de interesse particulares são *N. meningitidis* de qualquer um ou todos os grupos variantes, de grupos capsulares diversos, tais como Sorogrupo B de *N. meningitidis*, Sorogrupo C de *N. meningitidis*, Sorogrupo X de *N. meningitidis*, Sorogrupo Y de *N. meningitidis*, Sorogrupo W-135 de *N. meningitidis*, e outros.

MÉTODOS DE AVALIAR UMA RESPOSTA A UMA fHbp

[000195] A descrição presente fornece métodos para determinar a probabilidade que uma fHbp suscita uma resposta bactericida em um indivíduo; e métodos de avaliar uma fHbp variante para conveniência para inclusão em uma composição imunogênica.

DETERMINAÇÃO DA PROBABILIDADE QUE UMA fHbp SUSCITA UMA RESPOSTA BACTERICIDA

[000196] A revelação presente fornece um método de determinar a probabilidade que uma fHbp (por exemplo, uma fHbp presente em uma vacina de *Neisseria*) suscita uma resposta bactericida em um indivíduo para pelo menos uma cepa de *Neisseria meningitidis*. O método em geral envolve determinar a habilidade do anticorpo, presente em soro obtido de um indivíduo que foi imunizado com uma fHbp, de inibir a ligação de fH à fHbp. Inibição da ligação de fH à fHbp pelo anticorpo em um nível que é pelo menos cerca de 10% mais alto, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 2 vezes, pelo menos cerca de 10 vezes, pelo menos cerca de 50 vezes, pelo menos cerca de 100 vezes, ou maior que 100 vezes, que o nível de inibição de fH à fHbp por um anticorpo de controle que inibe a ligação de fH à fHbp mas que não gera uma resposta bactericida, indica que a fHbp é provável de suscitar

uma resposta bactericida para pelo menos uma cepa de *Neisseria meningitidis*. Em algumas modalidades, a fHbp é uma fHbp de ocorrência não-natural tendo afinidade inferior por fator humano H (fH) que a fHbp ID 1, como descrito acima.

[000197] O grau de inibição de ligação do fH à fHbp através do anticorpo suscitado para uma variante de fHbp pode ser determinado usando um ensaio como descrito aqui, ou qualquer outro ensaio conhecido. Por exemplo, o fH e/ou a fHbp podem compreender uma marcação detectável, e a inibição de ligação da fH/fHbp pode ser avaliada detectando a quantidade do componente marcado presente em um complexo de fH/fHbp e/ou detectando a quantidade de marcação presente em fH livre e/ou fHbp livre (por exemplo, fH ou fHbp não em um complexo de fH/fHbp).

[000198] Em um exemplo, os ensaios para avaliar a ligação de fH a uma fHbp envolvem o uso de fHbp imobilizado em um suporte (por exemplo, fHbp imobilizado no poço de uma placa de microtitulação). Uma mistura de uma concentração fixa de fH humano com diluições dos anticorpos de teste (por exemplo, antissoro, por exemplo, de um animal de teste humano ou não-humano (por exemplo, camundongo) que recebeu uma dosagem de suscitação de anticorpo de uma composição imunogênica) é acrescentada aos poços e incubada por uma quantidade de tempo suficiente para permitir ligação de anticorpo. Após lavar os poços, fH ligado é detectado com um antissoro de anti-fH específico (por exemplo, cabra ou burro) contendo um componente marcado, ou um anticorpo marcado secundário (por exemplo, antissoro de coelho anticabra ou antiburro). Porcentagem de inibição de fH ligado pode ser calculada pela quantidade de fH ligado na ausência de anticorpo humano ou de camundongo adicionado.

[000199] Em outra variação de tais ensaios, a ligação de fH às bactérias vivas na presença ou ausência de antissoros de teste é avaliada

através de citometria de fluxo. As células bacterianas são incubadas com uma concentração fixa de fH (por exemplo, fH detectavelmente marcado) e diluições diferentes de soros de teste contendo anticorpo. As bactérias são lavadas e fH ligado é detectado (por exemplo, como descrito acima).

[000200] Desse modo, a habilidade do antissoro de um indivíduo imunizado com uma fHbp para inibir ligação de fH/fHbp serve como um substituto para avaliar a atividade bactericida do antissoro diretamente. Um método da revelação presente para determinar a probabilidade que uma fHbp suscita uma resposta bactericida em um indivíduo pode fornecer informação a clínico ou outra pessoa da área médica sobre se uma composição imunogênica particular foi efetiva em suscitar uma resposta bactericida em um indivíduo.

[000201] Indivíduos imunizados podem ter uma titulação de anticorpo de anti-fHbp de IgG sérica similar por ELISA. Antissoros que fornecem melhor inibição geral da ligação de fH é indicativo de uma resposta de anticorpo de anti-fHbp mais efetiva, de melhor qualidade, e conferirão maior proteção. Desse modo, por exemplo, se comparar a resposta do anticorpo de anti-*Neisseria* em dois indivíduos (pelos anticorpos de anti-fHbp, isto é, uma diluição de soro de 1:10.000 inibe comparada a uma diluição de 1:3000 pelo outro indivíduo) o indivíduo com a atividade inibidora mais alta tem anticorpo de anti-fHbp de qualidade melhor que conferirá maior proteção. O ensaio de inibição de fH é desse modo um substituto para ensaios de titulação bactericida mediada por complemento, cujos ensaios de titulação bactericida mediada por complemento são em geral mais demorados e difíceis de medir que a inibição de fH.

AVALIAÇÃO DE UMA fHbp VARIANTE

[000202] A revelação presente fornece métodos de avaliar ou prognosticar a probabilidade que uma variante de fHbp será eficaz de sus-

citar uma resposta de anticorpo bactericida em um indivíduo. Os métodos em geral envolvem avaliar a habilidade do anticorpo específico para a variante de fHbp de inibir ligação de fH à fHbp. A resistência à inibição de ligação de fH à fHbp através de anticorpo suscitado imunizando com uma variante de fHbp positivamente correlata com a atividade bactericida de anticorpo suscitado para a variante de fHbp. Uma variante de fHbp que suscita o anticorpo que inibe a ligação de fH à fHbp em uma diluição sérica alta é considerada um candidato adequado para uma vacina para suscita proteção contra uma ou mais cepas de *Neisseria*.

[000203] Por exemplo, a revelação presente fornece um método de determinar a probabilidade que uma fHbp de ocorrência não-natural que tem afinidade inferior por fH humano que a fHbp ID 1 suscite anticorpos bactericidas em um indivíduo para pelo menos uma cepa de *Neisseria meningitidis*. O método em geral envolve determinar a habilidade de um anticorpo suscitado em um animal não humano de teste para fHbp de ocorrência não-natural para inibir a ligação de fH à fHbp. Inibição da ligação de fH à fHbp pelo anticorpo suscitado para fHbp de ocorrência não-natural a um nível que é pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 2 vezes, pelo menos cerca de 10 vezes, pelo menos cerca de 50 vezes, pelo menos cerca de 100 vezes, ou maior que 100 vezes, mais alto que o nível de inibição de fH à fHbp por um anticorpo suscitado no animal não-humano de teste para fHbp ID 1 indica que a fHbp de ocorrência não natural é provável de suscita uma resposta bactericida para pelo menos uma cepa de *Neisseria meningitidis*.

[000204] Animais não humanos de teste adequados incluem, por exemplo, camundongos, ratos, coelhos, e outros. O grau de inibição da ligação de fH à fHbp através de anticorpo suscitado para uma vari-

ante de fHbp pode ser determinado usando um ensaio como descrito aqui, ou qualquer outro ensaio conhecido. Atividade bactericida de um anticorpo é facilmente determinada usando um ensaio como descrito aqui, ou qualquer outro ensaio conhecido.

[000205] Um método em questão para determinar a probabilidade que uma fHbp de ocorrência não-natural dada que tem afinidade inferior por fH humano que a fHbp ID 1 suscite anticorpos bactericidas em um indivíduo para pelo menos uma cepa de *Neisseria meningitidis* é útil para identificar imunógenos adequados (e/ou eliminando imunógenos inadequados), por exemplo, no curso de desenvolvimento da vacina.

EXEMPLOS

[000206] É entendido que os exemplos e as modalidades descritas aqui são para propósitos ilustrativos apenas e que várias modificações ou alterações à luz dos mesmos serão sugeridas às pessoas versadas na técnica e são para ser incluídas dentro do espírito e esfera deste pedido de patente e escopo das reivindicações em anexo. Todas as publicações, patentes, e pedidos de patente citados aqui são por este meio incorporados por referência em sua totalidade para todos os propósitos.

VISÃO GERAL DOS EXEMPLOS

[000207] Fator H (fH) está presente em concentrações altas em soro (~200 a 800 µg/ml). Ligação de fH à fHbp é específica para fH humano (Granoff et al. (2009) *Infect Immun* 77:764). Uma implicação é que quando os seres humanos são imunizados com fHbp, a molécula pode formar um complexo com fH. Em contraste, quando primatas não humanos ou outros animais experimentais são imunizados, o antígeno é apresentado ao sistema imune sem fH ligado. Em seres humanos, a presença de fH em um complexo com fHbp pode afetar a imunogenicidade da fHbp (por exemplo, cobrindo os epítomos e afetando a apresentação de antígeno).

[000208] Fornecido aqui é evidência que a presença de fH humano diminui as respostas protetoras dos anticorpos a uma vacina de fHbp que liga fH. Adicionalmente, enquanto certas vacinas mutantes com uma ou duas substituições de aminoácido não ligam fH (por exemplo, E218A e/ou E239A), as mutações específicas usadas para alterar a molécula causaram alterações que diminuiram a habilidade das vacinas para suscitar anticorpos bactericidas em soro. Mutantes de aminoácidos simples adicionais (por exemplo, mutantes de R41S ou R41A de fHbp ID 1; mutantes R41S de fHbp ID 4, 9, 74 ou fHbp I quimérica; R130A de fHbp ID 1; R80A, D211A, E218A, E248A, ou mutantes de G236I de fHbp ID 22; um mutante T220A/H222A de fHbp ID 22; mutantes R41S/K113A, R41S/K119A, R41S/D121A, ou R41S/K113A/D121A de fHbp ID 77; e um mutante K199A ou E218A de fHbp ID 28) foram identificados que tinham diminuído a ligação de fH. Uma vacina de fHbp com a mutação de R41S não tinha diminuído a habilidade para suscitar anticorpos bactericidas e a presença de fH humano deu respostas protetoras dos anticorpos mais altas que a vacina de fHbp ID 1 do tipo selvagem que ligou fH. Outras mutações tais como K241E de fHbp ID 1 ou E241K em fHbp ID 15, que formam a estrutura de cristal de fHbp ID 1, são prognosticadas entrar em contato com fH, e não teve nenhum efeito na ligação do fH. Ainda a mutação de R41S que diminuiu a ligação de fH em fHbp ID 1, 4, 9, e 74 não diminuiu a ligação de fH em fHbp ID 22 ou 77. Mutações (tais como R41S em fHbp ID 1 e outras mutações debatidas abaixo) que diminuiram a ligação de fH mas tiveram efeito mínimo ou nenhum na conformação de fHbp de modo que a vacina mutante suscita anticorpos bactericidas, podem resultar em candidatos de vacina superiores. Desse modo, as variantes de fHbp são fornecidas que mantêm e apresentam um epítipo conformacional ligado por anticorpos bactericidas que têm atividade bactericida para uma ou mais cepas de *Neisseria meningitidis*.

[000209] Detalhes dos estudos que levaram a esta descoberta estão expostos abaixo.

MATERIAIS E MÉTODOS

[000210] *Modelo de camundongo transgênico de fH humano.* O cDNA de fH de complemento humano (cfh) de 3,9 kbp foi clonado no plasmídeo pCAGGS (Niwa et al. (1991) *Gene* 108:193-9). Embriões de camundongo BALB/c foram microinjetados com fragmento de restrição de *Sall-PstI* de ~6 kbp, e implantados em camundongos BALB/c fêmeas pseudoprenhas. A expressão de fH humano em soros de filhotes de cães foi detectada por western blot.

[000211] *Concentrações de fH humano em soro.* Para distinguir o fH humano e de camundongo, um ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) de captura de fHbp que especificamente liga fH humano foi usado. FHbp recombinante (2 µg/ml) em solução salina tamponada de fosfato estéril (PBS) foi acrescentada aos poços das placas de microtitulação. Após bloquear com 1% de albumina de soro bovino (BSA), as diluições de soros de camundongo pré-imune ou humanos foram adicionadas. fH humano ligado foi detectado usando antissoro de fH anti-humano de ovelha (Lifespan Biosciences, Seattle, WA; diluição 1:2000). O ELISA foi desenvolvido com IgG de antiovelha conjugado com fosfatase alcalina. O substrato de fosfatase, fosfato de p-nitrofenila (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foi adicionado e após incubação em temperatura ambiente por 30 min, a densidade óptica a 405 nm foi medida. As concentrações de fH foram determinadas em comparação às diluições de um soro de referência humano contendo 471 µg/ml de fH. fH foi medido em soros de 25 sujeitos adultos na área da San Francisco Bay como um controle que participaram em um protocolo aprovado por IRB para triar soros normais como fontes de complemento para ensaios bactericidas em soro.

[000212] *Vacinas de fHbp recombinante.* Proteínas recombinantes de

FHbp do tipo selvagem e mutante R41S foram purificadas como descrito (Beernink PT *et al.* (2008) *Infect Immun* 76:2568-2575). Imunogenicidade da vacina foi avaliada em camundongos BALB/c de seis a oito de idade do tipo selvagem ou transgênicos de fH humano, usando um protocolo aprovado pela University of Massachusetts Medical School Institutional Animal Care and Use Committee. Três doses de vacina contendo 20 µg de fHbp adsorvidos com 600 µg de hidróxido de alumínio foram administradas intraperitonealmente em intervalos de três semanas. A vacina conjugada do grupo C meningocócico de controle (Meningitec; Wyeth, Montreal, Canadá) continha 2 µg de polissacarídeo e 3 µg de CRM₁₉₇ adsorvidos com 100 µg de fosfato de alumínio.

[000213] *Análises estatísticas.* Testes t de Student bicaudal foram usados para comparar as titulações de média geométrica recíprocas (GMT) das respostas de anticorpo em soro entre dois grupos independentes de camundongos. Um teste t unicaudal foi também usado para examinar se as respostas de anticorpo de anti-fHbp dos camundongos transgênicos imunizados com a vacina de fHbp do tipo selvagem não eram inferiores que os camundongos do tipo selvagem imunizados. Foram usados modelos de regressão linear geral para testar se o tipo de vacina de fHbp e as concentrações de fH humano afetaram as respostas do anticorpo bactericida em soro. Para satisfazer a suposição de normalidade, tanto das medições do anticorpo bactericida em soro como as concentrações de fH foram transformadas por log₁₀ em análises de regressão e de correlação. Um valor P bicaudal de menos ou igual a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

EXEMPLO 1: LIGAÇÃO DE fH HUMANO DIMINUI A IMUNOGENICIDADE DE UMA VACINA DE fHbp.

[000214] Ligando de fH à fHbp pode cobrir epítomos e prejudicar as respostas de anticorpo direcionadas a porções da molécula de fHbp expostas na superfície das bactérias, que são muito efetivas para a

atividade bactericida. Uma vez que ligando de fH humano a fHbp é específico para fH humano, o efeito de fH em imunogenicidade de vacina foi investigado usando um fH humano modelo de animal transgênico. As concentrações de fH humano em soros foram medidas dos camundongos transgênicos usando uma ELISA de captura de fHbp descrita acima que é específica para fH humano. Poços de controle continham um fH humano purificado em concentrações que variam de 0,15 a 5 µg/ml (Figura 1, PAINEL A). Poços experimentais continham diluições diferentes de soros de camundongo transgênico (diluições de 2 vezes seriais começando em 1:100). As concentrações de fH humano em soros dos camundongos transgênicos foram >100 µg/ml. Os filhotes da mesma ninhada fator H-negativos no soro tiveram concentrações < 12 µg/ml que foi o limite mais baixo do ensaio). Camundongos do tipo selvagem conhecidos também tiveram fH humano < 12 µg/ml). Para comparação, as concentrações de fH nas amostras de soro armazenadas de doadores de complemento adultos >100 µg/ml) (Figura 1, PAINEL B). Nos experimentos descritos abaixo, filhotes da mesma ninhada de camundongos transgênicos com < 12 µg/ml ou camundongos do tipo selvagem conhecidos serão referidos como camundongos do "tipo selvagem".

[000215] No Estudo 1, camundongos do tipo selvagem ou transgênicos de fH humano foram imunizados com uma vacina de fHbp recombinante que ligou fH humano (TABELA 1 abaixo). Três semanas após a terceira injeção da vacina, as respostas de anticorpo bactericida em soro dos camundongos transgênicos foram 8 vezes mais baixas que os camundongos do tipo selvagem cujos fH de soro não ligou a vacina (GMT recíproco de 59 vs. 453 em camundongos do tipo selvagem, P=0,03). O Estudo 1 não incluiu uma vacina de controle que não ligasse fH. Portanto, deve ser determinado se a imunogenicidade mais baixa da vacina de fHbp nos camundongos transgênicos resultou da liga-

ção do antígeno de vacina com fH humano, ou se os camundongos poderiam ter tido respostas de anticorpo em soro mais baixas aos antígenos da vacina em geral. No Estudo 2, a vacinação de fHbp foi repetida e incluiu grupos de camundongos transgênicos e do tipo selvagem imunizados com uma vacina conjugada de polissacarídeo-CRM197 do grupo C meningocócica que não ligaram o fH humano. As respectivas respostas de IgG e anticorpo bactericida em soro dos camundongos transgênicos imunizados com a vacina conjugada meningocócica não foram significativamente diferentes daqueles dos camundongos do tipo selvagem (Figura 2). Como observado no Estudo 1, camundongos transgênicos imunizados no Estudo 2 com a vacina de fHbp que ligaram fH humano tiveram respostas de anticorpo bactericida em soro mais baixas (GMT recíproco de 31 vs. 115 em camundongos do tipo selvagem, $P=0,05$, teste t unicaudal). Ainda, houve uma correlação inversa entre as concentrações de fH humano nos soros dos camundongos transgênicos e respostas de anticorpo bactericida em soro à vacina de fHbp que ligou fH humano (Figura 3, PAINEL A; coeficiente de correlação Pearson, $r = -0,65$; $P=0,02$). Desse modo, quanto mais alto a concentração de fH humano em soro, menor a resposta bactericida em soro à vacina.

[000216] Em ambos os estudos, as respostas de anticorpo de anti-fHbp de IgG sérica dos camundongos transgênicos foram mais baixas que os camundongos do tipo selvagem (estudo 1, GMT recíproco de 30.000 vs. 97.000, $P=0,03$; estudo 2, GMT recíproco de 107.000 vs. 190.000 ($P=0,025$). Coletivamente os dados indicaram que a ligação de fH humano à vacina de fHbp prejudicou as titulações de anticorpo de anti-fHbp de IgG e as respostas de anticorpo bactericida.

TABELA 1. Respostas de anticorpo bactericida em soro mediado por complemento de camundongos do tipo selvagem ou transgênicos de fH humano imunizados com uma vacina de fHbp recombinante que

ligou fH humano

Estudo	Camundongos	No. de Camundongos	Vacina de fHbp	1/Titulação Bactericida	
				Log ₁₀ Médio ± SE	Média Geométrica
1	WT	7	WT	2,66 ±0,21 ^a	453
1	Tg de fH	10	WT	1,77 ±0,27 ^b	59
2	WT	14	WT	2,06 ±0,20 ^c	115
2	Tg de fH	14	WT	1,49 ±0,27 ^d	31

[000217] A vacina de fHbp WT ligou fH. ^{a,b}P=0,03 (bicaudal); ^{c,d}P=0,05 (hipótese unicaudal com base nos resultados do estudo 1.

EXEMPLO 2: MUTANTES DE fHbp NAS POSIÇÕES 218 E/OU 239 RESULTARAM NA LIGAÇÃO DIMINUÍDA A fH.

[000218] Um mutante de fHbp com duas substituições de alanina nos resíduos de glutamato 219 e 239 (E218 e E239) foi observado eliminar a ligação de fH (Schneider MC et al. (2009) *Nature* 458:890-3). Mutantes de fHbp recombinantes E218A, E239A e E218A/E239A foram preparados mediante purificação por meio de cromatografia de afinidade Ni²⁺ como descrito (Beernink et al (2010) *Clin Vaccine Immunol* 17:1074-8). Ligação de fH humano aos mutantes de fHbp foi executada por ELISA usando mutante recombinante purificado ou fHbp WT como o antígeno na placa como descrito acima. Usando este método, confirmou-se que o mutante duplo tinha ligação diminuída de fH (Figura 4). Ainda, os mutantes de fHbp com mutações individuais em E218 ou E239 também tinham ligação diminuída de fH humano (Figura 4).

EXEMPLO 3: AS fHbps MUTANTES E218A E/OU E239A TIVERAM IMUNOGENICIDADE PREJUDICADA EM CAMUNDONGOS DO TIPO SELVAGEM.

[000219] As respectivas fHbp ID1 do tipo selvagem e fHbp mutante dupla E218A/E239A foram submetidas à eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE). FHbps recombinantes ex-

pressas em *Escherichia coli* foram purificadas por cromatografia de afinidade de Ni²⁺ e cinco µg de proteína purificada foram carregados sobre o gel. Um gel de gradiente de poliacrilamida NuPAGE a 4-12% (Invitrogen, Carlsbad, CA) foi passado a 200 V por 45 min em tampão de MES (Invitrogen) e tingido com Simply Blue Safe Stain (Invitrogen). Os padrões de massa molecular foram Kaleidoscope Broad Range (Bio-Rad, Richmond, CA). As proteínas foram visualizadas por tingimento Coomassie blue e tiveram massas e pureza similares (Figura 5).

[000220] A ELISA de inibição (Beernink et al (2010) *Clin Vaccine Immunol* 17:1074-8) foi executada tanto para a fHbp ID1 do tipo selvagem como o mutante duplo E218A/E239A. A placa de ELISA foi revestida com fHbp recombinante (ID 1) a 2 µg/ml durante a noite a 4°C. Após bloquear com PBS/1% de BSA, MAbs de anti-fHbp murinos (JAR 1 ou JAR 4 a 0,5 µg/ml; mAb 502 ou JAR 5 a 0,1 µg/ml) e diluições seriais de cinco vezes do inibidor de proteína recombinante solúvel iniciando a 50 µg/ml (concentrações finais) foram pré-misturadas e acrescentadas aos poços da placa e incubada por 1 h a 37 °C. Ligação dos MAbs foi detectada com IgG de anticamundongo de cabra conjugada com fosfatase alcalina (1:10.000; Sigma-Aldrich) por 1 h em temperatura ambiente. A placa foi desenvolvida como descrito acima no Exemplo 1. Os resultados mostram que os epítomos reconhecidos por quatro MAbs de anti-fHbp foram preservados no mutante duplo de E218A/E239A comparado com fHbp do tipo selvagem como julgado pela habilidade da proteína mutante ou do tipo selvagem solúvel para inibir a ligação de cada um dos mAbs à fHbp do tipo selvagem, que foi adsorvida nos poços da placa de microtitulação (Figura 6).

[000221] A estabilidade térmica das fHbps foi também determinada. Proteínas recombinantes purificadas foram submetidas à diálise contra PBS (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) durante a noite a 4°C. A concentração foi medida através de absorvância de UV a 280 nm

usando um coeficiente de extinção molar de $0,8940 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e ajustado para uma concentração de $0,5 \text{ mg/ml}$. Solução de proteína desgasificada e PBS foram carregados na amostra e as células de referência, respectivamente, de um microcalorímetro de VP-DSC (MicroCal, Northampton, MA). A taxa de aquecimento foi 60°C/h e o ajuste de ganho médio foi usado. Os dados foram corrigidos na linha base usando um tampão vs. varredura de tampão e normalizados com base na concentração de proteína. O mutante duplo E218A/E239A teve estabilidade térmica similar à da proteína do tipo selvagem (Figura 7A), como também um mutante R41S (Figura 7B).

[000222] A imunogenicidade das vacinas de fHbp ID 1 do tipo selvagem (WT) e do mutante E218A/E239A foi medida em quatro estudos em camundongos (Estudos 3-6). No Estudo 3, os camundongos de CD-1 foram imunizados com três doses de fHbp WT ou mutante recombinante adsorvida com o Adjuvante de Freund (FA) ou hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$); no Estudo 4, os camundongos de CD-1 foram imunizados com uma dose da fHbp do tipo selvagem (WT) ou mutante adsorvida com hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$); nos estudos 5 e 6, os camundongos BALB/c foram imunizados com três doses de fHbp WT ou mutante adsorvidas com hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$). No Estudo 3, os soros foram agrupados (3 fundos gerais por grupo de vacina, cada fundo geral de soros de 3 a 4 camundongos). Nos Estudos 4, 5 e 6, os soros individuais foram analisados ($N = 7$ a 9 camundongos por grupo de vacina).

[000223] Para medir as titulações de IgG de anti-fHbp em soro, as placas de ELISA foram sensibilizadas com fHbp ID 1 recombinante a $2 \mu\text{g/ml}$ durante a noite a 4°C . Após bloquear com PBS/1% de BSA, as diluições de antissoro de camundongo (cinco vezes seriais iniciando a 1:100) foram acrescentadas aos poços da placa e a placa foi incubada por 1 h a 37°C . Os anticorpos de anti-fHbp ligados foram detectados

com IgG de anticamundongo de cabra (1:10.000; Sigma-Aldrich, St., Louis, MO) por 1 h em temperatura ambiente. A placa foi desenvolvida usando substrato de fosfato de p-nitrofenila (Sigma-Aldrich, St., Louis, MO) em temperatura ambiente por 30 min e a densidade óptica a 405 nm foi medido.

[000224] Como mostrado na Figura 7C e D, em todos os quatro estudos (Estudos 3, 4 e 5, Figura 7C; e estudo 6, Figura 7D), o mutante duplo E218A/E239A tinha diminuído as respostas de anticorpo de anti-fHbp de IgG sérica nos camundongos BALB/c ou CD-1 convencionais comparados com a vacina de fHbp do tipo selvagem de controle. As respectivas diferenças foram significativas ($P < 0,05$) para os estudos 4, 5 e 6 quando os soros individuais foram ensaiados em vez de os soros agrupados usados no estudo 3. Estudo 6 (Figura 7D) também incluiu uma vacina de fHbp mutante com uma substituição de aminoácido simples, E239A, que mostrou titulações de IgG mais baixas que a vacina de fHbp WT ($p=0,05$).

[000225] TABELA 2, abaixo, resume as respostas de anticorpo bactericida em soro para a vacina mutante E218A/E239A conforme medida contra cepa do grupo B H44/76. Em todos os estudos, a vacina mutante suscitou titulações bactericidas em soro mais baixas. As respectivas diferenças foram significativas nos estudos 4, 5 e 6 ($P < 0,05$).

[000226] Nestes estudos, nem a fHbp de mutante duplo nem a do tipo selvagem ligou fH de camundongo. Não obstante, a imunogenicidade mais baixa do mutante E218A/E239A indicou que epítomos importantes para suscitar anticorpos bactericidas protetores foram perturbados mediante a introdução das duas mutações. Como tal, as mutações de E218A/E239A que eliminaram a ligação de fH não necessariamente mantiveram as características estruturais ótimas da vacina para suscitar anticorpos protetores.

TABELA 2. Respostas de anticorpo bactericida em soro mediadas por

complemento de camundongos do tipo selvagem imunizados com a vacina de fHbp mutante E218A/E239A.

Estudo ^a	Cepa de camundongo	No. de Doses	Vacina de fHbp			
			WT		Mutante E218A/E239A	
			1/Titulação de Log ₁₀ Médio ±2SE	1/GMT	1/Titulação de Log ₁₀ Médio ±2SE	1/GMT
3	CD-1	3	2,63±0,54	427	2,31±0,25	206
4	CD-1	1	1,26±0,36 c	18	0,80±0,14 c	6
5	BALB/c	3	3,30±0,30 d	1986	1,68±0,60 d	48
6	BALB/c	3	1,89 ±0,22e	77	0,95 ±0,26e	9

Atividade bactericida foi medida com complemento de humano contra cepa H44/76. Nos estudos 3, 5 e 6, os camundongos foram imunizados com três doses de vacina. No estudo 4, uma dose foi dada.

^cP < 0,05
^dP < 0,05
^eP = 0,01

EXEMPLO 4: IDENTIFICAÇÃO DE UMA VARIANTE DE fHbp NATURAL COM LIGAÇÃO DE fH DIMINUÍDA.

[000227] Nos estudos de ligação de fH através das variantes de fHbp de ocorrência natural dentro da subfamília B previamente descrita (Fletcher et al (2004) *Infect Immun* 72:2088-2100), também referido como grupo de variantes 1 (Masignani et al. (2003) supra), as proteínas recombinantes de duas variantes de fHbp, IDs 14 e 15, mostraram ligação de fH significativamente menos dependente da concentração que à da proteína de fHbp ID 1 (Figura 8). Em contraste, a fHbp ID 14 mostrou a ligação dependente da concentração esperada com MAb de anti-fHbp JAR 4 e JAR 5, e a fHbp ID 15 mostrou a ligação esperada com mAb de anti-fHbp JAR 5 mas não JAR 4 (Nota, fHbp ID 15 não foi esperada ligar com JAR 4 porque esta proteína é desprovida do epítipo) (Beernink et al. (2009) *Mol Immunol* 46:1647-1653; Pajon et al. (2009) *Vaccine* 28:2122-2129)).

[000228] Os dados anteriores indicaram que fHbp representativa dos grupos de variantes 1, 2 ou 3 mostrou respectiva ligação com fH similar (Shaughnessy J et al. (2009) *Infect Immun* 77:2094-103). Como tal,

a ligação diminuída de fH através de duas variantes de fHbp de ocorrência natural (fHbp IDs 14 e 15 como mostrado na Figura 8) foi inesperado.

[000229] Os dados obtidos como representado na Figura 8 exibindo ligação de fH baixa através de duas variantes de fHbp de ocorrência natural indicam que os resíduos de amino que contribuem para tal ligação de fH mais baixa podem ser identificados por análise de alinhamentos das sequências de aminoácidos de fHbp de aglutinantes de fH altos e baixos. Esta estratégia seria diferente de uma que visa resíduos conservados, tais como os resíduos de E218A e E239A.

[000230] Variantes de fHbp podem ser subclassificadas de acordo com as combinações diferentes de cinco segmentos variáveis, cada derivado de uma das duas linhagens genéticas, designados tipos α ou β (Pajon et al. (2009) *Vaccine* 28:2122; Beernink e Granoff (2009) *Microbiology* 155:2873-83). fHbp ID 1 com ligação de fH alta e ID 14 com ligação de fH baixa estão ambos no grupo modular I (todos os cinco segmentos são tipos alfa). Em contraste, o segundo aglutinante de fH baixo, fHbp ID 15, está no grupo modular IV, que são quimeras naturais (com um segmento A do tipo β e segmentos B, C, D e E do tipo α). Portanto, como um controle para o segmento A β do peptídeo ID 15, a sequência do peptídeo ID 28 variante de ligação de fH naturalmente alta foi usada, que contém apenas segmentos β (grupo modular II). Os respectivos alinhamentos de aminoácido são mostrados nas figuras 19A E 19D. Para propósitos de comparação das sequências das variantes diferentes, resíduos específicos são referidos aqui com base na numeração de fHbp ID 1. Um destes resíduos de aminoácido, serina (S), na posição 41 do segmento A (β) do peptídeo 15 (ligação baixa de fH) diferiu do resíduo de prolina (P) do segmento A β de controle do peptídeo 28 (ligação de fH alta). Um segundo aminoácido, E na posição 241 nos segmentos E α de ambas as variantes de ligação baixa

de fH, diferiu dos de K na posição 241 da variante do peptídeo 1 de ligação alta de fH.

EXEMPLO 5: IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS MUTANTES DE fHbp NA POSIÇÃO 41 COM LIGAÇÃO DE fH DIMINUÍDA

[000231] O resíduo de arginina na posição 41 (R41) formou uma ligação de hidrogênio carregado com fH (Figura 9, PAINEL A). Arginina foi substituída por serina para eliminar esta ligação carregada (S41, painel inserido à direita em baixo). Os poços das placas de microtitulação foram revestidos com fHbp WT ID 1 recombinante ou mutante R41S ID 1. Por ELISA, o mutante R41S não ligou fH humano (Figura 10, PAINEL A). MAbs de anti-fHbp de controle, JAR 4 e JAR 5, ligaram quase identicamente às fHbps mutantes e fHbp do tipo selvagem (Figura 10, PAINÉIS B e C). Estes controles indicaram que quantidades comparáveis das respectivas proteínas foram adsorvidas nos poços da placa de microtitulação. Ainda, a mutação de R41S que estava no mesmo domínio e bem próxima ao epítipo conformacional de fHbp reconhecido pelo MAb de JAR 4 (Beernink PT (2009) *Mol Immunol* 46:1647-53), não afeta a ligação do MAb. Uma mutação adicional em fHbp ID 1 em que a alanina foi substituída por arginina, R41A também não ligou fH (Figura 10A). Desse modo, as substituições diferentes que serina na posição 41 também podem diminuir a ligação de fH.

[000232] Em experimentos de ressonância de plasmon de superfície, fH humano (2400 unidades de resposta) foi imobilizado em uma fatia de CM5 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) por meio do acoplamento da amina e a ligação de fHbp solúvel foi medida. A proteína mutante R41S (0,5 μ M) não mostrou nenhuma ligação com fH (-0,6 unidade de resposta) comparada com +22,5 unidades de resposta com 0,5 μ M do respectivo antígeno de fHbp do tipo selvagem que independentemente confirmou os resultados por ELISA. A proteína mutante R41S também teve estabilidade térmica comparada com a da fHbp do tipo selvagem

(Figura 7, PAINEL B).

[000233] A mutação de R41S também eliminou ligação de fH quando a mutação foi introduzida em outras variantes da sequência de fHbp no grupo de variantes 1, grupo modular I. Estas incluíram fHbp ID 4, 9, e 74 (Figura 11, PAINÉIS A, C, e E, RESPECTIVAMENTE). Porém, a mutação de R41S em três variantes de sequência no grupo de variantes 2 (grupos modulares III ou VI) não diminuiu a ligação de fH. Estas incluem fHbp ID 19, 22 e 77 (Figura 12, PAINÉIS A, C, e E, RESPECTIVAMENTE).

EXEMPLO 6: IMUNOGENICIDADE DE fHbp MUTANTE R41S EM CAMUNDONGOS DO TIPO SELVAGEM

[000234] Em camundongos do tipo selvagem, a vacina de fHbp de mutante R41S (ID 1) suscita respostas de anticorpo bactericida em soro similares como a vacina do tipo selvagem (TABELA 3, abaixo, Estudos 2 e 6). No estudo 6, uma vacina de fHbp mutante dupla, E218A/E239A, que foi previamente relatado não ligar ao fH (Schneider MC et al. (2009) *Nature* 458:890-3), mas teve imunogenicidade prejudicada em camundongos WT (Beernink et al. (2010) *Clin Vaccine Immunol* 17:1074), serviram como um controle negativo. Esta vacina suscita titulações bactericidas significativamente mais baixas (TABELA 3, Estudo 6), e desse modo confirmou os dados descritos na TABELA 2 acima, mostrando respostas de anticorpo diminuídas à vacina de E218A/E239A de possível perda dos epítomos ou desestabilização secundária da molécula mutante (Beernink et al. (2010) *Clin Vaccine Immunol* 17:1074-8). Em contraste, as respostas de anticorpo normais para a vacina de fHbp de mutante R41S indicaram que a substituição de serina por arginina não diminuiu a imunogenicidade em um modelo de camundongo onde fH não ligou às vacinas de fHbp mutante ou do tipo selvagem.

TABELA 3. Respostas de anticorpo bactericida em soro mediadas por

complemento de camundongos do tipo selvagem imunizado com vacinas de fHbp recombinantes de fHbp.

Estudo	Camundongos	No. de Camundongos	Vacina de fHbp	1/Titulação Bactericida	
				Log ₁₀ Médio ±SE	Média Geométrica
2	WT	14	WT	2.06 ±0.20	115 ^a
2	WT	13	R41S	1.92 ±0.20	83 ^b
6	WT	9	WT	1.89 ±0.22	77 ^c
6	WT	9	E218A/E239A	0.95 ±0.26	9 ^d
6	WT	9	R41S	1.85 ±0.31	71 ⁱ

[000235] A vacina de fHbp WT ligou fH humano; o mutante R41S e o mutante E218A/E239 previamente descrito (Schneider et al. (2009) *Nature* 458:890-3) não ligam a fH humano. Em camundongos WT, fH nativo não liga a qualquer vacina (Figura 1, Painel D). ^{a,b}P=0,62; ^{c,d}P=0,01; ^{d,i}P=0,92, por testes de T (bicaudal).

EXEMPLO 7: RESPOSTAS DE ANTICORPO BACTERICIDA EM SORO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS IMUNIZADOS COM A VACINA DE fHbp MUTANTE R41S

[000236] Camundongos transgênicos de fH humano imunizados com a vacina mutante R41S que não ligou fH humano tiveram respostas de anticorpo bactericida em soro ~3 vezes mais altas que os camundongos transgênicos de fH humano imunizados com a vacina de fHbp do tipo selvagem de controle que ligou fH (Estudo 2, TABELA 4 abaixo). Quando os dados foram estratificados através das concentrações de fH humano em soro, os camundongos com concentrações de fH < 250 µg/ml mostraram respostas similares às vacinas mutantes e do tipo selvagem. Porém, entre os camundongos com concentrações de fH humano >250 µg/ml, aqueles imunizados com a vacina mutante R41S tiveram respostas de anticorpo bactericida 10 vezes mais altas que aqueles imunizados com a vacina de fHbp do tipo selvagem que liga-

ram fH humano ($P < 0,05$; TABELA 4).

TABELA 4. Respostas de anticorpo bactericida em soro de camundongos transgênicos de fH humano imunizados com a vacina mutante R41S

Estudo	fH humano, $\mu\text{g/ml}$	No. de Camundongos	Vacina de fHbp	1/Titulação Bactericida	
				Log_{10} Médio \pm SE	Média Geométrica
2	>100	14	WT	$1,49 \pm 0,27^a$	31
2	>100	13	R41S	$1,98 \pm 0,23^b$	96
Análise estratificada através de concentração de fH humano					
2	<250	7	WT	$2,02 \pm 1,16^c$	105
2	<250	8	R41S	$2,11 \pm 0,78^d$	129
2	≥ 250	6	WT	$0,80 \pm 0,10^e$	6
2	≥ 250	5	R41S	$1,78 \pm 0,44^f$	60

[000237] A vacina de fHbp WT ligou fH humano; o mutante R41S não ligou fH humano. Os dados para camundongos transgênicos de fH humano imunizados com a vacina do tipo selvagem estão mostrados no estudo 2, TABELA 1 acima. ^{a,b}Usando modelos gerais de regressão linear, o efeito da vacina mutante R41S ou do tipo selvagem de fHbp diferiu por concentração de fH humano em soro na titulação bactericida, $P=0,018$. ^{c,d} $P>0,5$. ^{e,f} $P=0,05$.

[000238] Em camundongos transgênicos de fH humano imunizados, não houve nenhuma correlação significativa entre as respostas de anticorpo bactericida em soro para a vacina de fHbp mutante que não ligou fH humano e as concentrações de fH humano em soro (Figura 3, PAINEL B; $r = +0,17$; $P=0,58$), enquanto que como descrito acima (Figura 3, PAINEL A), nos camundongos transgênicos houve uma correlação inversa com as titulações bactericidas suscitadas pela vacina do tipo selvagem que ligou fH ($r = -0,65$; $P=0,02$). Os respectivos coeficientes de correlação para as duas vacinas foram significativamente diferentes um do outro ($P=0,03$).

[000239] Modelos gerais de regressão linear foram usados para confirmar se o tipo de vacina de fHbp (fHbp do tipo selvagem ou mutante

R41S) ou a concentração em soro de fH humano afetou as respostas de anticorpo bactericida em soro dos camundongos transgênicos. Houve uma interação significativa entre o tipo de vacina de fHbp e a concentração de fH humano na resposta bactericida (teste de razão de probabilidade, $P=0,018$). Com base no modelo de regressão, as razões dos GMTs bactericidas em soro recíprocos foram estimadas para camundongos transgênicos imunizados com a vacina mutante R41S sobre aqueles de camundongos transgênicos imunizados com a vacina de fHbp que ligou fH humano em várias concentrações de fH humano em soro (Figura 3, PAINEL C). Embora não houve nenhuma diferença significativa nas respostas bactericidas quando as concentrações de fH humano em soro foram baixas ($< 250 \mu\text{g/ml}$), as respostas bactericidas à vacina mutante R41S foram significativamente mais altas quando as concentrações de fH de soro foram mais altas ($\text{fH}>250 \mu\text{g/ml}$, $P < 0,05$; $\text{fH}>316 \mu\text{g/ml}$, $P < 0,01$). Uma vez que muitos seres humanos têm concentrações de fH nesta faixa (Figura 1, PAINEL B), os resultados nos camundongos transgênicos sugerem que as moléculas de fHbp mutante que não ligam fH possam ser vacinas superiores em seres humanos.

[000240] Os protocolos experimentais de vários estudos de imunização apresentados acima, como também os resultados, estão resumidos na tabela abaixo.

TABELA 5. Sumário dos estudos de imunização em camundongos transgênicos de fH humano.

Estudo	Cepa de Camundongo BALB/c	Vacina(s) Meningocócica(s)	fH ligado à vacina	Resultados
1	Tg de fH humano	Proteína de ligação ao fator H (fHbp)	Sim ¹	Resposta mais baixa de IgG sérica e de anticorpo bactericida de camundongos Tg, cujo fH humano ligou-se ao antígeno da vacina
	Controle do tipo selvagem	fHbp	Não ²	

Estudo	Cepa de Camundongo BALB/c	Vacina(s) Meningocócica(s)	fH ligado à vacina	Resultados
2A	Tg de fH humano	fHbp	Sim ¹	Confirmou respostas mais baixas de IgG sérica e de anticorpo bactericida de camundongos Tg
	Controle do tipo selvagem	fHbp	Não ²	
2B	Tg de fH humano	Conjugado de PS-CRM do grupo C	Não ³	Camundongos do tipo selvagem e de Tg mostraram respectivas respostas quase idênticas de IgG sérica e bactericidas para uma vacina meningocócica de controle que não ligou fH
	Controle do tipo selvagem	Conjugado de PS-CRM do grupo C	Não ⁴	
2C	Tg de fH humano	fHbp	Sim ¹	<ul style="list-style-type: none"> - Respostas mais altas de anticorpo bactericida sem soro à fHbp mutante que não ligou fH, especialmente aos camundongos com níveis altos de fH humano sérico. - Para a vacina que ligou fH humano, a correlação inversa entre a titulação bactericida sérica e a concentração de fH humano sérica. - Para a vacina mutante que não ligou fH humano, nenhuma correlação significativa entre as titulações bactericidas séricas e concentrações de fH humano sérico. Consequentemente, em camundongos vacinados com fHbp mutante, titulações bactericidas séricas foram independentes das concentração de fH humano sérico.
	Tg de fH humano	fHbp de mutante R41S	Não ⁵	

[000241] Figura 2, PAINEL D fornece uma ilustração esquemática de cada protocolo experimental que corresponde aos vários estudos apresentados aqui. O número acima de cada ilustração na Figura 2D corresponde aos sobrescritos na tabela acima. Conjugados de PS-CRM do Grupo C são um conjugado de polissacarídeo do grupo C meningocócico (PS) e um toxoide de difteria mutante reativo cruzado

(CRM) e são referidos como MenC-CRM na Figura 2, painel D.

EXEMPLO 8: O REPERTÓRIO DE ANTICORPO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS IMUNIZADOS PREFERENCIALMENTE COM A VACINA DE fHbp MUTANTE R41S LIGA EPÍTOPOS PRÓXIMOS DO SÍTIO DE LIGAÇÃO DE fH

[000242] A importância da ligação de fH humano que cobre epítomos de fHbp em suscitar anticorpos com atividade funcional protetora foi testada. A habilidade de fH humano endógeno presente em diluições 1:100 de soros de camundongos transgênicos para ligar à fHbp por ELISA foi medida. Como esperado, na ausência de anticorpos de anti-fHbp em soro, houve ligação similar de fH humano em soros de pré-imunização dos dois grupos de vacina e os camundongos transgênicos (Tg) de controle dado hidróxido de alumínio sozinho (Figura 13, PAINEL A). Não houve nenhuma ligação nos camundongos de WT de controle dado hidróxido de alumínio uma vez que o fH nativo não ligou à fHbp. Após vacinação, havia menos fH humano "livre" detectado nos soros de camundongos imunizados com o FHbp de mutante R41S que nos soros de camundongos imunizados com a vacina que ligou fH humano ($P=0,001$, Figura 13, PAINEL B), ou em soros de camundongos transgênicos dado hidróxido de alumínio sozinho (Figura 13, PAINEL B). Uma vez que as respectivas titulações de anticorpo de anti-fHbp de IgG foram similares nos dois grupos de vacina de fHbp (Figura 13, PAINEL D), as concentrações de fH humano detectáveis mais baixas nos soros de R41S pós-imunização foram consistentes com maior habilidade dos anticorpos de anti-fHbp para inibir a ligação de fH humano à fHbp que os anticorpos de anti-fHbp suscitados pela vacina do tipo selvagem que ligou fH humano. Soros de camundongos individuais ($N=11$ por grupo) foram também testados em diluições diferentes na presença de 5% de soro humano normal como uma fonte de fH. Em diluições 1:100 e 1:400, a inibição foi significativamente maior no

grupo de vacina mutante R41S ($P < 0,03$), Figura 13, PAINEL C). Coletivamente, a maior inibição de fH no grupo de vacina mutante R41S sugeriu que houvesse diferenças no repertório de anticorpo suscitado pelas duas vacinas. Por exemplo, os anticorpos suscitados pela vacina de fHbp mutante podem ter sido direcionados mais nos epítomos próximos do sítio de ligação de fH, que seria mais efetivo no bloqueio da ligação de fH que o repertório de anticorpo suscitado pela vacina que ligou fH. Ainda, anticorpos direcionados nas regiões expostas às superfícies de fHbp que também ligam a fH seriam esperados ter maior atividade bactericida funcional.

[000243] Uma correlação significativa (valor r de Spearman, 0,69 e valor P de 0,0004) foi também observada entre a habilidade dos soros individuais de camundongo para inibir a ligação de fH humano à fHbp e a titulação bactericida de soro recíproca (Figura 13, PAINEL E). Na reação bactericida de soro, uma diminuição na ligação do fH de inibidor de complemento à superfície bacteriana do organismo de teste pode ter contribuído para as titulações bactericidas mais altas suscitadas pela vacina de fHbp mutante. Desse modo, a habilidade dos anticorpos de anti-fHbp para inibir a ligação de fH prognosticou a atividade do anticorpo protetor, que foi maior para a vacina de R41S.

EXEMPLO 9: IDENTIFICAÇÃO DE MUTANTES ADICIONAIS EM fHbp ID 1 COM LIGAÇÃO DE fH DIMINUÍDA

[000244] Posição 241 está na interface de ligação de fH de fHbp ID 1. O efeito das substituições de aminoácido na ligação de fH foi investigado no resíduo 241 na sequência de fHbp ID 1. Como mostrado na Figura 14, PAINEL A, a substituição do resíduo lisina (K) 241 com glutamato (E) (K241E) em fHbp ID 1 não teve nenhum efeito na ligação de fH. A substituição reversa, o mutante E241K de fHbp ID 15 no grupo modular IV (Figura 14, PAINEL C) também não mostrou nenhum efeito significativo na ligação de fH com relação à fHbp do tipo selva-

gem (< 2 vezes; Figura 14, PAINEL C). (Numeração dos resíduos de aminoácido é com base na sequência de fHbp ID 1.)

[000245] Em fHbp ID 1, as mutações nas posições R41, H119, R130, e K241. Os mutantes de fHbps foram produzidos como descrito acima. Os mutantes R41A, H119A, R130A, e K241E de substituição simples foram depois avaliados pela ligação ao fH humano, e pela ligação aos MAbs.

[000246] Como mostrado na Figura 10, PAINEL A, a substituição de R41S e a substituição de R41A em fHbp ID 1 reduziu a ligação ao fH humano. Como mostrado na Figura 10, PAINEL B E C, os mutantes R41S e R41A retiveram a ligação aos MAbs JAR 4 e JAR 5, respectivamente, o que indicou que estes epítomos são preservados nos mutantes R41S e R41A.

[000247] Como mostrado na Figura 15, PAINEL A, as substituições de H119A e de R130A em fHbp ID 1 reduziram a ligação ao fH humano. Como mostrado na Figura 15, os mutantes de H119A e R130A retiveram a ligação ao MAb JAR5 (painel B) e diminuíram a ligação ao MAb JAR4, comparou à fHbp ID 1 do tipo selvagem correspondente (painel C). Estes dados indicam que o epítomo de JAR5 é preservado nos mutantes H119A e R130A; e que o epítomo JAR 4 é preservado parcialmente pelas substituições de aminoácido.

EXEMPLO 10: MUTANTES EM VARIANTES DE SEQUÊNCIA DE fHbp DO GRUPO MODULAR IV DE fHbp

[000248] Os segmentos "V_A" nas variantes de sequência de fHbp do grupo de variantes 1 classificadas como variante 1, grupo modular IV (Figura 16) são derivados de uma linhagem genética diferente (β) que os segmentos "V_A" correspondentes nas variantes da sequência de fHbp do grupo modular I, de variante 1, que são designados como segmentos α (Beernink et al (2009) *Microbiology* 155:2873). As respectivas linhagens α e β podem também ser designadas como linhagens 1 e 2, de acordo com a nomenclatura adotada pelo sítio de rede

pubmlst.org/*Neisseria*/fHbp/.

[000249] Nas as variantes de sequência de aminoácidos de fHbp do grupo modular IV, frequentemente há uma serina na posição 41 em vez da arginina. Substituição da prolina por serina (S41P) em um mutante de fHbp ID 15 (grupo modular IV) eliminou a ligação de fH (Figura 17). Proteínas de controle incluíram fHbp IDs recombinantes 1 e 28 (aglutinantes de fH naturalmente altos) e fHbp ID 15 (naturalmente aglutinante de fH baixo). Ligação de MAb de fator humano H ou de anti-fHbp à fHbp foi medida por ELISA como descrito acima. MAb de anti-fHbp JAR 5 mostrou ligação similar com fHbp WT IDs 1 e 15, e o mutante S41P de fHbp ID 15 (Figura 17, PAINEL B). JAR 31 mostrou ligação esperada de fHbp ID 28 (Figura 17, PAINEL C).

EXEMPLO 11: SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDO DE R41S EM VARIANTES DE SEQUÊNCIA DE fHbp DOS GRUPOS MODULARES III E VI NÃO AFETAM A LIGAÇÃO DE fH.

[000250] Todas as variantes da sequência de fHbp classificadas como variante 2 são quimeras naturais contendo segmentos derivados das linhagens α e β (Figura 16). Especificamente, os segmentos "V_A" nas proteínas de variante 2 são derivados das linhagens α e como no grupo modular I frequentemente contêm um resíduo de arginina 41 (numeração dos resíduos de acordo com fHbp ID 1). Embora a substituição de R41S em todas as proteínas do grupo modular I testadas eliminassem a ligação de fH (Figuras 11 e 10 e TABELA 6), a mutação de R41S em fHbp ID 19, 22 e 77 do grupo de variantes 2 (grupos modulares III ou VI) não elimine a ligação de fH (Figura 12, PAINÉIS A, C e E, e TABELA 7).

EXEMPLO 12. PROTEÍNAS QUIMÉRICAS DE fHbp SINTÉTICAS QUE NÃO LIGAM fH HUMANO

[000251] Uma quimera I de fHbp (Beernink e Granoff (2008) *Infect. Immun.* 76:2568-75) é mostrada como o último esquemático modular

na Figura 16. O ponto de junção no qual parte da fHbp ID 1 (variante 1, grupo modular I) é fundida à parte de fHbp 77 (variante 2, grupo modular VI) é G136 que reside no segmento V_C . Na Figura 16, V_C é descrito como meio cinza e meio branco na proteína quimérica para representar a fusão de uma sequência de linhagem α com uma sequência de linhagem β naquele segmento. Quando a substituição de R41S foi introduzida na proteína de fHbp de variante 2, não houve nenhum efeito na ligação de fH (Figura 12, PAINÉIS A, C, e E). Em contraste, quando a substituição de R41S foi inserida na proteína de quimera I de fHbp, a mutação eliminou ligação de fH. (Figura 18). Estes resultados não foram antecipados uma vez que a única diferença de aminoácido entre os respectivos segmentos de V_A de quimera I e fHbp ID 77 foi um resíduo de aminoácido (Gly30 no antígeno quimérico em vez de Ser30; Figura 19). Houve diferenças em oito dos resíduos entre as posições 98 e 135 no segmento V_C , (Figura 19) que pode explicar por que a mutação de R41S eliminou a ligação de fH na proteína quimérica mas não nas proteínas de variante natural 2 (mostradas esquematicamente na Figura 16; e sequência de aminoácidos completa mostrada na Figura 19A). Estas observações implicam resíduos nesta porção da região de V_C como sendo importante para estabilidade da complexo de fHbp-fH em fHbps no grupo de variantes 2.

EXEMPLO 13. EFEITO DAS SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDOS ADICIONAIS EM fHbp ID 77 (GRUPO MODULAR VI) NA LIGAÇÃO DE fH

[000252] Mutações de alanina nas posições K113, K119, D121, foram introduzidas em fHbp ID 77 (Grupo Modular VI, grupo de variantes 2 antigênico). Como observado acima, o número de posição do resíduo é com base em fHbp ID 1. fHbps foram produzidas como descrito acima em Materiais e Métodos.

[000253] A habilidade destes mutantes para ligar a fH humano foi

testada por ELISA como descrito acima no Exemplo 2 e comparada à fHbp do tipo selvagem correspondente. Introdução da mutação de K119A aumentou a ligação de fH aproximadamente 4 vezes comparado à fHbp ID 77 do tipo selvagem (Figura 20, PAINEL A); K113A não teve nenhum efeito na ligação de fH (Figura 20, PAINEL A) enquanto D121A diminuiu a ligação de fH em cerca de 4 vezes comparado com a ligação de fH através de fHbp ID 77 do tipo selvagem (Figura 20, PAINEL A). JAR 31 de anti-fHbp ligou a todos os três mutantes, o que indicou que as respectivas substituições de aminoácido não afetaram o epítipo reconhecido por este mAb.

[000254] Substituições de aminoácido dupla, R41S/K113A, R41S/K119A e R41S/D121A também foram construídas em fHbp ID 77. O mutante R41S/K119A mostrou diminuição de cerca de 5 vezes na ligação de fH por ELISA (Figura 21, PAINEL A), enquanto os mutantes R41S/K113A e R41S/D121 tiveram cerca de 10 vezes menos ligação ao fH que a fHbp ID 77 do tipo selvagem (Figura 21, PAINEL A E TABELA 6). MAb de anti-fHbp JAR 31 mostrou ligação similar com todos estes três mutantes duplos de ID 77 e a fHbp ID 77 do tipo selvagem, o que indicou que havia quantidades similares de cada uma das variantes de fHbp aderidas aos poços de microtitulação e que estas substituições de aminoácido não afetaram o epítipo reconhecido por este mAb.

[000255] Uma substituição de aminoácido tripla R41S/K113A/D121A foi introduzida em fHbp ID 77. Este mutante triplo não exibiu nenhuma ligação de fH (Figura 22, PAINEL A). A fHbp mutante reteve a ligação a JAR 31 (Figura 22, PAINEL C), mas eliminou a ligação de JAR 4 (Figura 22, PAINEL B). Em contraste, o mutante duplo K113A/D121A teve cerca de 10 vezes diminuída a ligação de fH, o que indicou que estas substituições além da substituição de R41S contribuíram para a perda da ligação de fH.

EXEMPLO 14. EFEITO DAS SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDO EM

fHbp ID 22 (GRUPO MODULAR III) NA LIGAÇÃO DE fH

[000256] fHbp ID 22 é representativo das variantes de sequência de fHbp no grupo modular III (grupo de variantes 2, Figura 16). Foram introduzidas mutações em fHbp ID 22 nas posições R80, D211, E218, D248, G236 (TABELA 6), e R41, Q38, A235, Q126, D201 e E202 (TABELA 7). Os mutantes de fHbp foram produzidos como descrito acima. Especificamente, foram introduzidas substituições de R80A, D211A, E218A, E248A, R41S, Q38A, Q126A, G236I, A235G, D201A, e E202A isoladamente em fHbp ID 22. Além disso, substituições dupla de T220A/H222A foram introduzidas em fHbp ID 22. Os mutantes foram depois caracterizados pela ligação de fH e ligação aos mAbs de anti-fHbp por ELISA (TABELAS 6 E 7).

[000257] A habilidade destes mutantes para ligar ao fH humano foi testada como descrito acima no Exemplo 2, e comparada à habilidade de fHbp ID 22 do tipo selvagem de ligar ao fH humano. Os resultados estão mostrados na Figura 23, PAINÉIS A-C e resumidos na TABELAS 6 e 7. Como mostrado na Figura 23, os PAINÉIS A e B, as substituições de D211A, R80A, E218A, e E248A em fHbp ID22 reduziram a ligação a fH por mais que 50 vezes comparado com a ligação de fH pela fHbp ID 22 do tipo selvagem (Vide também TABELA 6). Como mostrado na Figura 23, PAINEL C, as substituições de R41S, Q38A, e Q126A não reduziram significativamente a ligação ao fH (< 4 vezes; vide também TABELA 7).

[000258] Como mostrado na Figura 24, PAINÉIS A e B, os mutantes de R80A, D211A, E218A, e E248A de fHbp ID22 retiveram a ligação ao MAb JAR31, indicando que o epítipo de JAR31 é preservado em cada um destes mutantes.

[000259] Como mostrado na Figura 25, PAINÉIS A e B, os mutantes D211A e E218A de fHbp ID 22 retiveram a ligação ao MAb JAR4, indicando que o epítipo de JAR4 é preservado nestes mutantes. Como

mostrado na Figura 25, o mutante R80A não reteve a ligação ao MAb JAR4 (painel A), e o mutante E248A mostrou ligação reduzida ao MAb JAR4 (painel B).

[000260] Como mostrado na Figura 26, PAINÉIS A e B, os mutantes R80A, D211A, E218A, e E248A de fHbp ID 22 retiveram a ligação ao MAb JAR35, indicando que o epítipo de JAR35 é preservado em cada um destes mutantes.

[000261] Como mostrado na Figura 27, PAINEL A, a substituição dupla de T220A/H222A e a substituição simples de G236I em fHbp ID 22 reduziu a ligação ao fH humano por mais que 50 vezes comparado com a ligação de fH através de fHbp ID 22 do tipo selvagem (Vide também TABELA 6). Como mostrado na Figura 27, o mutante T220A/H222A em fHbp ID 22 reteve a ligação ao MAb JAR31 (painel B), MAb JAR 35 (painel C), e MAb JAR 4 (painel D) indicando que os epítipos de JAR31, JAR35, e JAR4 são preservados no mutante T220A/H222A. Como mostrado na Figura 27, o mutante de G236I em fHbp ID 22 reteve a ligação ao MAb JAR 35 (painel C), mas exibiu ligação reduzida ao MAb JAR 31 (painel B), e teve pequena ou nenhuma ligação a JAR 4 (painel D).

[000262] Como mostrado na Figura 28, PAINEL A, as substituições simples R41S, Q38A, e A235G em fHbp ID 22 não reduziu significativamente a ligação ao fH humano. Como mostrado na Figura 28, os mutantes R41S, Q38A, e A235G retiveram a ligação ao MAb JAR31 (painel B), e ao MAb JAR 35 (painel C), indicando que os epítipos de JAR31 e JAR35 são preservados em cada um dos mutantes R41S, Q38A, e A235G.

[000263] Como mostrado na Figura 29, PAINEL A, as substituições simples de Q126A, D201A, e E202A em fHbp ID 22 não reduziram significativamente a ligação ao fH humano. Como mostrado na Figura 29, PAINEL B, os mutantes Q126A, D201A, e E202A retiveram a liga-

ção ao MAb JAR35, o que indicou que o epítipo de JAR35 é preservado em cada um destes mutantes.

[000264] O efeito de várias substituições simples e duplas de aminoácido na habilidade de fHbp ID 1, ID 22, e ID 77 para ligar ao fH humano, e ligar a vários anticorpos monoclonais, está resumido nas TABELAS 6 e 7.

TABELA 6 - Mutações que diminuem a ligação de fH						
Variante de Sequência de fHbp de Base (grupo modular*)	Mutação de Aminoácido	Diminuição em vezes na ligação de fH JAR 5 (Número da Figura)	Reatividade [†] de MAb de anti-fHbp			
			JAR 5	JAR 4	JAR 31	JAR 35
ID 1 (I)	Nenhuma (WT)	0	2	2	0	0
	R41S	>50 (F10)	2	2	NA	NA
	R41A	>50 (F10)	2	Não fez	NA	NA
	R130A	>50 (F15)	2	1	NA	NA
	H119A	>10 (F15)	2	1	NA	NA
	E218A	>50† (F4)	2	2	NA	NA
	E239A	>10† (F4)	2	2	NA	NA
	E218A/E239A	>50† (F4)	2	2	NA	NA
ID 4 (I)	R41S	>50 (F11)	2	2	NA	NA
ID 9 (I)	R41S	>50 (F11)	2	2	NA	NA
ID 74 (I)	R41S	>50 (F11)	2	2	NA	NA
ID 15 (IV)	Nenhuma (WT)	0	2	0	0	0
	S41P	>50 (F17)	2	NA	0	NA
ID 22 (III)	Nenhuma (WT)	0	0	2†	2	2
	R80A	>50 (F23)	NA	0	2	2
	D211A	>50 (F23)	NA	2	2	2
	E218A	>50 (F23)	NA	2	2	2
	E248A	>50 (F23)	NA	1	2	2
	G236I	>50 (F27)	NA	0	1	2
	T220A/H222A	>50 (F27)	NA	2	2	2
ID 77 (VI)	Nenhuma (WT)	0	0	2†	2	0
	R41S/K113A	>10 (F21)	NA	1	2	NA
	R41S/K119A	>5 (F21)	NA	1	2	NA
	R41S/D121A	>10 (F21)	NA	1	2	NA
	R41S/K113A/D121A	>50 (F22)	NA	0	2	NA

*Grupo modular com base nas linhagens de cinco segmentos variáveis, vide Figura 16. Grupo modular I e IV estão no grupo de variantes 1 antigênico; grupos modulares III e VI estão no grupo de variantes 2 antigênico.

†Comparado com a ligação de mAb à respectiva variante de sequência do

TABELA 6 - Mutações que diminuem a ligação de fH						
Variante de Sequência de fHbp de Base (grupo modular*)	Mutação de Aminoácido	Diminuição em vezes na ligação de fH (Número da Figura)	Reatividade [†] de MAb de anti-fHbp			
			JAR 5	JAR 4	JAR 31	JAR 35
tipo selvagem; 0, nenhuma ligação significativa para MAb; 1, ligação diminuída (>30% de diminuição), 2, ligação similar ou mais alta (< 30% de diminuição).						
†JAR 4 liga cerca de 30% menos à fHbp de variante 2 (isto é, ID 22 ou 77) que à variante 1 (isto é, ID 1)						
†Figura 5 da Publicação de Patente U. S. 2006/0029621						
**NA, não aplicável; para reatividade de mAb, o anticorpo não se liga à respectiva variante de sequência do tipo selvagem						

TABELA 7. Mutações que não diminuem a ligação de fH significativamente						
Variante de Sequência de fHbp de Base (Grupo Modular*)	Mutação de Aminoácido	Diminuição em vezes na ligação de fH* (No. da Figura)	MAbs de Anti-fHbp			
			JAR5	JAR4	JAR31	JAR35
ID 1 (I)	Nenhuma (tipo selvagem)	0	2	2	0	0
	K241E	0 (F14)	2	2	NA	NA
	Q87A	0	2	2	NA	NA
	Q113A	0	2	2	NA	NA
	I114A/S117A	0	2	2	NA	NA
	G121R	0	2	2	NA	NA
ID 15 (IV)	Nenhuma (Tipo selvagem)	0	2	0	0	0
	E241K	0 (F14)	2	NA	NA	NA
ID 19 (VI)	Nenhuma (tipo selvagem)	0	0	2		
	R41S	0 (F12)	NA	1	2	NA
ID 22 (III)	Q38A	0 (F28)	NA	1	2	2
	R41S	0 (F28)	NA	1	2	2
	A235G	0 (F28)	NA	1	2	2
	Q126A	0 (F29)	NA	2	2	2
	D201A	0 (F29)	NA	1	1	2
	E202A	0 (F29)	NA	1	2	2

TABELA 7. Mutações que não diminuem a ligação de fH significativamente				MAbs de Anti-fHbp			
Variante de Sequência de fHbp de Base (Grupo Modular*)	Mutação de Aminoácido	Diminuição em vezes na deligação de fH* (No. da Figura)					
			JAR5	JAR4	JAR31	JAR35	
ID 77 (VI)	R41S	0 (F12)	NA	ND***	2	NA	
	K113A	0 (F20)	NA	ND	2	NA	
	K119A	0 (F20)	NA	ND	2	NA	
	D121A	0 (F20)	NA	ND	2	NA	
*Grupo modular com base nas linhagens de cinco segmentos variáveis, vide Figura 16. Grupo modular I e IV estão no grupo variante 1 antigênico; grupos modulares III e VI estão no grupo de variantes 2 antigênico.							
*Comparado com a ligação de fH pela respectiva variante de fHbp do tipo selvagem.							
†Comparado com a ligação à respectiva variante de sequência do tipo selvagem; 0, nenhuma ligação significativa através de mAb; 1, ligação diminuída (>30% de diminuição), 2, ligação similar ou mais alta (< 30% de diminuição)							
**NA, não aplicável; mAb não liga à respectiva variante de sequência do tipo selvagem							
***ND, não testado							

[000265] Como mostrado na Figura 30, PAINEL A, as substituições simples de E218A em fHbp ID 28 reduziu a ligação ao fH humano comparado com a ligação de fH através de fHbp ID 28 do tipo selvagem. Também como mostrado na Figura 30, PAINEL A, as substituições simples de E197A, K245A, e D201A em fHbp ID 28 não reduziram a ligação a fH significativamente. Figura 30, PAINEL B mostra a ligação de antissoro de anti-fHbp ID28 policlonal de camundongo às várias proteínas (fHbp WT; e substituições simples de E197A, K245A, e D201A em fHbp ID 28). Os dados apresentados na Figura 30, PAINEL B indicam que as várias fHbps estão presentes na placa de ELISA em quantidades similares. Como mostrado na Figura 30, PAINÉIS C e D, o mutante E218A ligou aos MAbs de JAR 31 e JAR 33, indicando que as conformações gerais dos epítomos reconhecidos por estes MAbs são retidas.

[000266] A imunogenicidade geral dos mutantes de fHbp pode ser

determinada administrando os mutantes como vacinas aos camundongos do tipo selvagem cujo fH nativo não se liga às vacinas mutantes ou do tipo selvagem. Os dados gerados neste modelo fornecem uma avaliação geral de se ou não os epítomos importantes na suscitação de anticorpos bactericidas séricos são retidos na vacina mutante. Por exemplo, o mutante E218A/E239A em fHbp ID 1 eliminou a ligação com fH humano mas nos estudos múltiplos teve habilidade prejudicada para suscitar respostas de anticorpo bactericida em camundongos WT (TABELA 2, acima). Os experimentos de imunogenicidade são realizados como descrito acima no Exemplo 1. As titulações de IgG e anticorpos bactericidas são medidas e comparadas aos níveis correspondentes encontrados em camundongos administrados com os controles do tipo selvagem e/ou negativos correspondentes. Se os epítomos críticos necessários para suscitar a atividade bactericida forem retidos pela vacina mutante, a expectativa é que os níveis de anticorpo suscitados nos camundongos do tipo selvagem não serão significativamente diferentes que os níveis suscitados pela vacina de fHbp do tipo selvagem correspondente.

EXEMPLO 15. INDUÇÃO DA RESPOSTA BACTERICIDA ATRAVÉS DE VARIANTES DE fHbp

[000267] Camundongos BALB/c do tipo selvagem (cujo fH não liga à fHbp WT) foram imunizados intraperitonealmente com três doses de vacinas de fHbp recombinantes, com cada dose separada por intervalos de três semanas. Cada dose continha 10 µg de fHbp recombinante e 300 µg de Al(OH)₃ em um volume de 100 µl (composição de tampão final foi 10 mM de Histidina, 150 mM de NaCl, pH 6,5). As amostras de sangue foram obtidas através de furo cardíaco três semanas após a terceira dose.

[000268] Titulações bactericidas séricas foram medidas contra cepa do grupo B H44/76 (ID 1) ou cepa do grupo W-135 Ghana 04/07 (ID

22) usando complemento humano depletado de IgG (Beernink et al, *J Immunology* 2011). Não diferente, as titulações de média geométrica (GMTs) entre a respectiva vacina mutante e de WT não foram significativamente diferentes ($P > 0,10$ por teste T em titulações transformadas de \log_{10}).

[000269] Os dados estão mostrados nas figuras 31-33. Figura 31 mostra titulações bactericidas séricas de camundongos imunizados com mutantes de vacinas de fHbp ID 1 com ligação diminuída com fH humano. Cada símbolo representa a titulação de um camundongo individual medida contra cepa do grupo B H44/76 (ID 1). As linhas horizontais representam as titulações de média geométrica. Os respectivos GMTs de cada uma das vacinas mutantes não foram significativamente diferentes que aqueles suscitados pela vacina de fHbp ID 1 WT ($P > 0,10$).

[000270] Figura 32 mostra titulações bactericidas séricas de camundongos imunizados com vacinas de fHbp ID 22 mutante com ligação diminuída com fH humano. Cada símbolo representa a titulação bactericida de um camundongo individual medida contra cepa do grupo W-135 Ghana 7/04 (ID 22). Linhas horizontais representam as titulações de média geométrica. Painel superior. Vacinas mutantes (D211A, E218A, E248A e T220A/H222A) com GMTs não foram significativamente diferentes que as da vacina de WT ID 22 ($P > 0,10$). Painel inferior, vacinas mutantes (R80A e G236I) que suscitaram GMTs significativamente mais baixas que as da vacina de WT ID 22 ($P < 0,05$).

[000271] Figura 33 mostra titulações bactericidas séricas de camundongos imunizados com vacina de fHbp ID 77 mutante com ligação diminuída com fH humano. Cada símbolo representa a titulação bactericida de um camundongo individual medida contra a cepa do grupo W-135 Ghana 7/04 (ID 22). As linhas horizontais representam as titulações de média geométrica. Camundongos imunizados com a vacina

de mutante triplo de R41S/K113A/D121A ID 77 tiveram uma GMT significativamente mais baixa que os camundongos imunizados com vacina de WT ($P < 0,05$).

[000272] TABELA 8 resume os dados de imunogenicidade mostrados nas figuras 31-33. Não diferente, as titulações de média geométrica (GMTs) entre a respectiva vacina mutante e de WT não foram significativamente diferentes ($P > 0,10$ por teste T em titulações transformadas de \log_{10}).

TABELA 8. Imunogenicidade dos mutantes de fHbp com ligação de fH ligar diminuída

fHbp ID	Vacina de fHbp	Atividade bactericida		
		No de Camundongos	Cepa	Titulações vs. Respeetivo WT
1	WT	14	H44/76	n/a
1	R41S	14	H44/76	Não Diferente
1	R41A	14	H44/76	Não Diferente
1	R130A	12	H44/76	Não Diferente
1	E239A	12	H44/76	Não Diferente
22	WT	10	Ghana 04/07	n/a
22	D211A	10	Ghana 04/07	Não Diferente
22	E218A	10	Ghana 04/07	Não Diferente
22	E248A	10	Ghana 04/07	Não Diferente
22	T220A/H222A	10	Ghana 04/07	Não Diferente
22	R80A	10	Ghana 04/07	Inferior
22	G236I	10	Ghana 04/07	Inferior
77	WT	12	Ghana 04/07	n/a
77	R41S/K113A/D121A	12	Ghana 04/07	Inferior

EXEMPLO 16. Alinhamentos de sequência

[000273] Figuras 34 E 35 apresentam alinhamentos de sequência de aminoácidos de fHbp ID 1 (SEQ ID NO: 1), fHbp ID 22 (SEQ ID NO: 2), fHbp ID 77 (SEQ ID NO: 4), fHbp ID 28 (SEQ ID NO: 3), e sequências de aminoácidos de quimera de ID1/ID77 (SEQ ID NO: 8). ID 28 é mostrado como uma sequência de referência para grupo de variantes 3 de fHbp. Resíduos de ligação de fator H da interface (realçados em cinza) são como descritos em Schneider et al. ((2009) *Nature* 458:890-3) descritos como ligação de hidrogênio ou interações iônicas. GEHT (SEQ ID NO: 27) na posição 136 a 139 representam o ponto de junção entre ID 1 e ID 77 para a fHbp quimérica.

[000274] Figura 35. Alinhamento de sequências de aminoácidos fHbp ID 1 (SEQ ID NO: 1), fHbp ID 22 (SEQ ID NO: 2), fHbp ID 77 (SEQ ID NO: 4), fHbp ID 28 (SEQ ID NO: 3), e quimera de ID1/ID77 (SEQ ID NO: 8). Resíduos realçados em cinza indicam resíduos mutados e estão resumidos na TABELA 7.

TABELA 9, abaixo, resume a reatividade de MAb de fHbp ID 1, ID 22, ID 77, e ID 28.

TABELA 9

ID	Variante	Grupo modular	Reatividade de MAb
1	1	I	JAR 4, JAR 5
22	2	III	JAR 4, JAR 31, JAR 35
77	2	VI	JAR 4, JAR 31, JAR 35
28	3	II	JAR 31, JAR 33

EXEMPLO 17. EFICÁCIA DA INIBIÇÃO DA LIGAÇÃO DE fH/fHbp CORRELATA COM A ATIVIDADE BACTERICIDA; E O PAPEL DE NspA

MATERIAIS E MÉTODOS

[000275] MAbs de anti-fHbp murino. As linhagens celulares de hibridoma que produzem anticorpos monoclonais murinos fHbp-específicos (mAbs) JAR 3 (IgG3), JAR 5 (IgG2b) e mAb502 (IgG2a; Giuliani et al. (2005) *Infect. Immun.* 73:1151; e Scarselli et al. (2009) *J. Mol. Biol.*

386:97) foram usadas. MAbs de controle incluíram SEAM 12 (Granoff et al. (1998) *J. Immunol.* 160:5028), que reagem com a cápsula do grupo B e um anti-PorA P1.7 (código de NIBSC 01/514, obtido do National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, Reino Unido).

[000276] *mAbs de anti-fHbp de camundongo quimérico de IgG1 humana*. RNA isolado das células de hibridoma foi convertido em cDNA usando um kit Omniscript RT (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. cDNA foi amplificado usando iniciadores de imunoglobulina específicos para cadeias pesada (H) e leve (L) (Wang et al. (2000) *Infect. Immun.* 68:1871) e inserido no vetor de pGem (Promega) para sequenciação. Com base nas sequências determinadas, iniciadores específicos foram projetados para facilitar a inserção do sequências de VH e VL murinas em um vetor de expressão eucariótico bicistrônico de FRT modificado (Invitrogen). Para cada anticorpo, a sequência de VL murina foi inserida a jusante de uma sequência líder de cadeia L capa humana, e na estrutura com um sequência constante de cadeia L capa humana. A sequência de VH murina foi inserida a jusante de uma sequência líder de cadeia H humana, e na estrutura com uma sequência de região constante de IgG1 humana completa. O vetor utilizou uma sequência de Segmento de Entrada Ribossômico Interno (IRES) entre as sequências VH e VL para facilitar a tradução equilibrada de ambas as cadeias. As sequências de DNA de todas as construções foram verificadas antes da transfecção.

[000277] Células CHO de Flp-In (Invitrogen) foram banhadas a $3,5 \times 10^5$ células por poço (em 2 ml de meio de Flp-In) em placas de Nunclon Delta de 6 poços e depois incubadas a 37°C, 5% de CO₂ durante a noite. Uma vez as células alcançaram 80% de confluência, elas foram transfeccionadas com o vetor pOG44 e de FRT contendo os insertos de VH e VL (razão 9:1) usando o reagente de transfecção Trans-

Fast (Promega). Quarenta e oito horas após a transfecção, as células foram tripsinadas e colocadas em uma placa de 6 poços fresca sob seleção de fármaco com 600 µg/ml de higromicina. As células transfectadas foram adaptadas à cultura de suspensão livre de soro usando meio Excell 302 (Sigma Aldrich), e crescidas durante cerca de 2 semanas. Anticorpo do sobrenadante de cultura de célula foi concentrado antes da purificação usando uns 200 ml de célula agitada (Amicon) e aplicando pressão de gás de nitrogênio. O anticorpo foi purificado usando colunas de proteína de HiTrap G (GE Healthcare) seguido por diálise extensiva contra PBS. BSA foi acrescentada a uma concentração final de 1% e as alíquotas foram armazenadas a -30°C.

[000278] *ELISA*. As concentrações dos mAbs quiméricos de camundongo de IgG1 humana foram determinadas por uma ELISA de captura com anticorpo específico para cadeia κ anti-humano (Biosource) ligado aos poços de uma placa de microtitulação. IgG humana ligada foi detectada por anticorpo de IgG anti-humana de cabra conjugado com fosfatase alcalina (Invitrogen). As concentrações de anticorpo foram atribuídas por comparação com ligação dependente da concentração de um padrão de IgG1 humana (anticorpo de cadeia κ monoclonal de mieloma humano, Sigma). Ligação dos mAbs de anti-fHbp à fHbp foi medida por ELISA com fHbp recombinante na placa. O anticorpo detector secundário era o anticorpo específico para cadeia κ anti-humano de cabra conjugado com fosfatase alcalina (Biosource).

[000279] *Ressonância de plasmon de superfície*. A cinética de ligação dos mAbs quiméricos humanos-de camundongo para fHbp foi medida por ressonância de plasmon de superfície com fHbp recombinante imobilizada (500 ou 1000 unidades de resposta) em fatias de CM5 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) que foi executada por meio de acoplamento de amina (kit de Acoplamento de Amina, GE Healthcare). Cinéticas de ligação foram determinadas em concentrações de mAb que variam

de 0,016 a 50 µg/ml (0,1 µM a 333 µM) usando um instrumento Biacore T / 100 (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

[000280] *Ligação a N. meningitidis através de citometria de fluxo.* Ligação dos mAbs quiméricos à superfície das bactérias encapsuladas vivas foi medida com cepa H44/76 (B:15:P1.7,16; ST-32), que é um expressor relativamente alto de fHbp ID 1 (Welsch et al. (2008) *J. Infect. Dis.* 197:1053; Welsch et al. (2004) *J. Immunol.* 172:5606). Em alguns experimentos, mutantes isogênicos geneticamente silenciados (KO) de H44/76 em que fHbp, NspA ou ambas as proteínas não foram expressas, foram testados. Os respectivos genótipos foram fHbp:Erm, NspA:Spc, e fHbp:Erm/NspA:Spc (Lewis et al. (2010) *PLoS Pathog.* 6:e1001027). O ensaio de ligação foi previamente executado como descrito, exceto que os anticorpos de teste ou de controle foram incubados juntos com as células por 1 h em temperatura ambiente em vez de 2 h em gelo. Anticorpo ligado às bactérias foi detectado por IgG anti-humana de cabra CF488A (BioTium).

[000281] *Inibição da ligação de fH.* A habilidade dos mAbs de anti-fHbp para inibir a ligação de fH à fHbp foi medida por ELISA. Os poços foram revestidos de uma placa de microtitulação com fHbp recombinante (2 µg/ml). Diluições dos mAbs foram adicionadas e incubadas a 37°C por 2 h, seguido por fH humano (Complement Tech.), 2 µg/ml, que foi incubado por um adicional de 1 hora em temperatura ambiente. Após lavar com PBS-0,05% de Tween 20, fH ligado foi detectado por um antissoro policlonal de ovelha a fH (Abcam) seguido por anticorpo de IgG de antiovelha de burro (Sigma Aldrich) conjugado com fosfatase alcalina. Os resultados foram expressados como a porcentagem de inibição de ligação de fH na presença de um mAb de anti-fHbp comparado com ligação de fH na ausência do mAb.

[000282] A habilidade dos mAbs de anti-fHbp para inibir a ligação de fH à superfície das células bacterianas vivas foi medida através de ci-

tometria de fluxo. As bactérias de H44/76 foram incubadas com 50 µg/ml de mAb de anti-fHbp e concentrações diferentes de fH purificado por 30 min em temperatura ambiente. Após lavar as células, fH ligado foi detectado por um antissoro policlonal de ovelha para fH (Lifespan Bioscience) seguido por anticorpo de IgG de antiovelha de burro (Invitrogen) conjugado com tintura verde fluorescente Alexa Fluor 488. Em alguns experimentos, 20% de soro humano depletado de IgG, que continha 90 µg/ml de fH, foram usados como a fonte de fH humano. O soro humano foi aquecido por 30 min a 56° C para inativar os componentes de complemento termoinstáveis essenciais para bacteriólise. Este tratamento de calor não afetou a atividade do fH.

[000283] *Fontes de complemento humanas.* A fonte de complemento primária para medição da atividade bactericida e deposição de C4b foi soro de um adulto saudável com atividade complementar hemolítica total normal e nenhum anticorpo bactericida de soro detectável contra a cepa de teste. Para eliminar os anticorpos de IgG não-bactericidas que poderiam aumentar ou inibir a atividade dos mAbs de teste, a fonte de complemento foi depletada de IgG usando uma coluna de proteína G (HiTrap Protein G, GE Life Sciences, Piscataway, NJ). Uma alíquota de soro humano de 1 ml foi passada em uma coluna de proteína G (1 ml de Proteína de HiTrap G, GE Life Sciences, Piscataway, NJ) equilibrada com PBS e a fração passante foi colhido. Suficiência de depleção de IgG foi monitorada por um ELISA de captura de IgG, e a atividade de CH50 foi ensaiada com um ensaio comercial (kit de teste EZ Complement CH50, Diamedix Corp., Miami, FL). Para evitar bacteriólise ao medir a deposição de C4b, a fonte de complemento foi depletada de C6 usando uma coluna de afinidade de C6 de complemento anti-humano, como previamente descrito (Plested e Granoff (2008) *Clin. Vaccine Immunol.* 15:799). Em alguns experimentos, as fontes de complemento humanas comerciais que tinham sido depletadas de fH

ou C1q (Complement Tech.), que foi também depletada de IgG como descrito acima, foram usadas.

[000284] *Ensaio bactericida sérico*. Atividade bactericida foi previamente medida como descrito (Beernink et al. (2009) *J. Infect. Dis.* 199:1360) usando bactérias de fase logarítmica da cepa do grupo B H44/76 e 20% de soro humano depletados de IgG como uma fonte de complemento. Imediatamente antes de executar o ensaio, os mAbs de anti-fHbp foram centrifugados por duas horas a 100.000 x g para remover os agregados. Atividade bactericida (BC_{50%}) foi definida pela concentração de mAb que resultou em uma diminuição de 50% em CFU/ml após incubação de 60 min na mistura de reação comparada com o CFU/ml em poços de controle negativo em tempo zero.

[000285] *Deposição de C4b dependente de C1q em N. meningitidis*. Citometria de fluxo foi usada para medir a deposição de C4b humano na superfície das bactérias vivas da cepa do grupo B H44/76. As bactérias foram crescidas como descrito acima para o ensaio bactericida e foram incubadas com 5% de soro humano depletado de C1q (Complement Tech.) que tinha sido também depletado de complemento C6 para evitar bacteriolise (Vide acima). Concentrações diferentes dos mAbs de anti-fHbp humanos-de camundongo quiméricos foram adicionadas com ou sem 20 µg/ml de proteína de C1q purificada (Complement Tech.). C4b humano ligado às bactérias foi detectado com C4b anti-humano conjugado com isotiocianato de fluorescência (Meridian Life Science).

RESULTADOS

[000286] mAbs de JAR 3 e JAR 5 inibem a ligação um do outro à fHbp, e reconhece os epítomos de sobreposição que envolvem glicina e lisina nas posições 121 e 122, respectivamente. Os respectivos epítomos reconhecidos pelos dois parátomos foram diferenciados por ligação dissimilar através de western blot com variantes de sequência de

aminoácidos de fHbp diferentes. Os hibridomas murinos JAR 3 e JAR 5 foram derivados dos mesmos genes da linhagem germinal de VH e VL, mas diferiram em sequência em suas respectivas regiões de CDR (com a exceção de CDR2 de VL). O mAb502 murino foi codificado por genes da linhagem germinal de VH e VL diferentes que aqueles de JAR 3 ou JAR 5. mAb502 reconhece um epítipo conformacional que requer uma arginina na posição 204, e não inibe a ligação de JAR 3 ou JAR 5 à fHbp. Desse modo, mAb502 reconhece um epítipo de fHbp diferente daqueles reconhecidos pelos mAbs de JAR. Os números de acesso do Genbank para os genes de vL e vH de mAb502 são EU835941 e EU835942, respectivamente. Os números de acesso do GenBank para regiões de VL e VH de anticorpos de JAR3 e JAR5 são como segue: JF715928, cadeia pesada variável de JAR3; JF715929, cadeia de leve variável de JAR3; JF715926, cadeia pesada variável de JAR5; e JF715927, cadeia de leve variável de JAR5.

[000287] Figura 36. Modelo de fHbp em um complexo com um fragmento de fH, com base nas coordenadas da estrutura de cristal (Schneider et al. (2009) *Nature* 458:890). Relação espacial dos resíduos de aminoácido previamente relatados afetar a ligação de mAb502 de anti-fHbp, e JAR 3 e JAR 5 ao fragmento de fH de fHbp, cinza claro, é mostrada em complexo com fHbp.

[000288] *Os três mAbs de anti-fHbp quiméricos de camundongo de IgG1 humana têm características de ligação similares.* Três anticorpos de anti-fHbp quiméricos humanos-de camundongo foram construídos, em que cada um dos parátomos JAR 3, JAR 5 e mAb502 foram pareados com uma região constante de IgG1 humana. Em um ELISA com fHbp recombinante adsorvida nos poços de uma placa de microtitulação, os três mAbs mostraram respectiva ligação similar (Figura 37, PAINEL A). Para ressonância de plasmon de superfície, as respectivas cinéticas de ligação com 200, 500 ou 1000 RU de fHbp imobilizada

foram similares para os três mAbs, que foram cada testados em concentrações de 0,016 a 2,25 µg/ml. Dados representativos para 0,25 µg/ml (1,7 µM) de mAb e 1000 RU de fHbp ID 1 imobilizada estão mostrados no Painel B. Embora mAb502 mostrasse ligação de pico mais baixa à fHbp que JAR 3 ou JAR 5, as respectivas taxas de associação, K_a , foram similares (4,25E+06, 2,26E+06 e 1,19E+06, para JAR 3, JAR 5 e mAb 502, respectivamente). As taxas de dissociação foram lentas para todos os três mAbs, o que impediu o cálculo das constantes de dissociação precisas. A ordem de magnitude dos valores de K_d para cada um do mAbs foi E-05.

[000289] Ligação de mAb à superfície das bactérias vivas da cepa do grupo B H44/76 foi medida através de citometria de fluxo de fluorescência indireta. As concentrações de mAb entre 0,8 e 40 µg/ml, a respectiva ligação dos três mAbs foi indistinguível um do outro. Os resultados de ligação obtidos com 4 µg/ml estão mostrados na Figura 37, Painel C. Ligação não foi afetada pela presença de 20% de soro humano depletado de IgG termoinativado, que continha ~90 µg/ml de fH humano (Comparar Figura 37, Painel D com Figura 37, Painel C).

[000290] Figuras 37-D. Ligação de mAbs fHbp-específicos à fHbp. A. ELISA. IgG ligado foi detectado com um anticorpo conjugado com fosfatase alcalina específico para cadeia capa anti-humano. B. Ressonância de plasmon de superfície. Ligação dos mAbs de anti-fHbp (0,25 µg/ml) à fHbp recombinante imobilizada (1000 RU). C. Citometria de fluxo. Ligação dos mAbs de anti-fHbp (4 µg/ml) com células bacterianas vivas da cepa de *N. meningitidis* do grupo B H44/76. JAR 3, linha pontilhada preta; JAR 5, linha cinza; mAb502, linha preta. Um mAb irrelevante (100 µg/ml) foi um controle negativo (histograma preenchido de cinza). As curvas de ligação dos três mAbs de anti-fHbp estão sobrepostas. D. Citometria de fluxo. As mesmas concentrações de mAb como no Painel C com a adição de 20% de soro humano depletado de

IgG como uma fonte de fH humano (~90 µg/ml).

[000291] *Todos os três mAbs quiméricos humanos-de camundongo ativam a via de complemento clássica humana mas apenas JAR 3 e JAR 5 têm atividade bactericida.* Ativação da via de complemento clássica é iniciada quando IgG ligar à superfície bacteriana e houver complexo de antígeno-anticorpo suficiente para permitir as regiões de Fc próximas do anticorpo ligar a C1q, que por sua vez ativa C4b. Ligação de C4b à superfície das células de *N. meningitidis* vivas da cepa do grupo B H44/76 foi medida como um substituto para a ligação de C1q e ativação de C4b, e como um marcador para ativação da via de complemento clássica.

[000292] Quando a fonte de complemento era 5% de soro humano depletado de C1q que tinha sido também depletado de IgG, houve deposição de C4b desprezível suscitada pelos mAbs de anti-fHbp (Figura 38, PAINEL A). Quando 20 µg/ml de C1q purificado foram acrescentados de volta à mistura de reação, cada um dos mAbs ativou a deposição de C4b (Figura 38, PAINEL B). Embora ligação de cada um dos mAbs ativasse a via de complemento clássica, apenas JAR 3 e JAR 5 tiveram atividade bactericida mediada por complemento (Figura 38, PAINEL C). As concentrações médias \pm SE para 50% de matança em três ensaios foram $9 \pm 0,85$ µg/ml para JAR 3; 15 ± 2 µg/ml para JAR 5 ($P=0,024$), e >100 µg/ml para mAb502 ($P < 0,0003$ comparado a JAR 3 ou JAR 5).

[000293] Figuras 38A-C. Ativação de complemento C1q-dependente nas bactérias encapsuladas do grupo B da cepa H44/76. A. Citometria de fluxo. Ativação da deposição de C4b por 4 µg/ml de mAb e complemento (5% de soro humano depletado de IgG) que tinha sido depletado de C1q. MAb de anti-fHbp JAR 3, linha pontilhada preta; JAR 5, linha cinza; mAb502, linha preta, e um mAb humano irrelevante (100 µg/ml; histograma preenchido de cinza) (são dados sobrepostos para

cada). B. Citometria de fluxo. Mesmos símbolos e condições que no Painel A com exceção da adição de 20 µg/ml de proteína de C1q purificada para as reações. C. Atividade bactericida. Sobrevivência das bactérias após incubação por 60 min a 37°C com cada um dos mAbs e complemento (20% de soro humano depletados de IgG).

[000294] *MAbs quiméricos JAR 3 e JAR 5, mas não mAb502, inibem a ligação de fH.* Em estudos anteriores, mAbs murinos JAR 3 e JAR 5 inibiram a ligação de fH à fHbp enquanto que o mAb502 murino não inibiu a ligação de fH. Por ELISA, os mAbs quiméricos JAR 3 e JAR 5 de IgG1 humana também inibiram a ligação de fH à fHbp enquanto o mAb502 quimérico não inibiu a ligação de fH (Figura 39, PAINEL A). Quando 20% de soro humano depletado de IgG termoinativado foi a fonte de fH, 50 µg/ml de JAR 3 ou JAR 5 quimérico, mas não mAb502, inibiram a ligação de fH à superfície das células bacterianas vivas (Figura 39, PAINEL B). Tão pouco quanto 2 µg/ml de JAR 3 ou JAR 5 também inibiram a ligação de fH (Painel C) embora a inibição fosse menos completa que com 50 µg/ml do mAb (Painel B).

[000295] Figuras 39A-C. Inibição da ligação de fH através de mAbs de anti-fHbp. A. ELISA: fH (4 µg/ml) com fHbp recombinante de fase sólida. B e C. Citometria de fluxo, com células bacterianas vivas da cepa do grupo B H44/76; área preenchida de cinza claro, bactérias com fH (~90 µg/ml) em 20% de soro humano depletado de IgG sem um mAb; linha sólida preta, as bactérias com fH de soro + mAb502, 50 µg/ml; linha pontilhada preta, bactérias com fH de soro + JAR 3, 50 µg/ml; linha sólida cinza, bactérias com fH de soro + JAR 5, 50 µg/ml; área preenchida de cinza escuro, bactérias sem fH ou mAb como um controle negativo. Ligação de fH foi detectada com um anticorpo de ovelha específico para fH. C. Mesmas condições que no Painel B exceto que 2 µg/ml de cada um dos mAbs de anti-fHbp foram testados em vez de 50 µg/ml.

[000296] A correlação observada entre a atividade bactericida e a inibição da ligação de mAb de fH não necessariamente prova que a inibição foi responsável pela atividade bactericida maior de JAR 3 ou JAR 5 que mAb502. Por exemplo, as relações espaciais dos epítomos de fHbp na superfície das bactérias que são reconhecidas por mAbs de anti-fHbp que inibiu a ligação de fH são diferentes que aquelas dos epítomos reconhecidos por mAbs de anti-fHbp que não inibiram a ligação de fH (comparar, por exemplo, as posições dos resíduos de aminoácido relatados previamente afetar a ligação de mAb502 (Scarselli et al. (2009) *J Mol Biol* 386:97-108) com aqueles de JAR 3 e JAR 5 (Beernink et al. (2008) *Infect Immun* 76:4232-4240)(FIGURE 36). Estas diferenças espaciais poderiam afetar a formação de um ataque de membrana funcional potencialmente complexo independente da infrarregulação de fH.

[000297] Para determinar se as diferenças nas localizações dos respectivos epítomos afetaram a atividade bactericida independente da inibição de fH, a atividade bactericida de anti-fHbp foi medida com complemento depletado de fH (20% de soro humano que também tinham sido depletados de IgG). Na ausência de fH, todos os três mAbs mostraram atividade bactericida mediada por complemento similar ($BC_{50\%}$, 1,2 a 1,4 $\mu\text{g/ml}$, TABELA 10). Em contraste, quando fH humano purificado foi acrescentado à mistura de reação, mAb502 não era mais bactericida ($BC_{50\%}$ >100 $\mu\text{g/ml}$, Painel B). fH adicionando à mistura de reação também diminuiu a atividade bactericida de dois mAbs de controle murinos reativos com a cápsula do grupo B ou PorA (comparar os respectivos valores medidos de $BC_{50\%}$ com complemento depletado de fH, Painel C, com aqueles com complemento repleto de fH, Painel C) mas o efeito de repleção de fH foi menos acentuado que com os mAbs de anti-fHbp.

TABELA 10. Atividade bactericida de MAb de anti-fHbp medida com

complemento humano depletado de fH

	Atividade bactericida (BC _{50%} , µg/ml)*			
	Complemento depletado de fH		Complemento repleto de fH	
	Média	Faixa	Média	Faixa
mAbs de anti-fHbp de camundongo quimérico de IgG1 humana				
JAR 3	1,4	0,8 - 2,0	15,2	12,5 - 18
JAR 5	1,25	1,0 - 1,5	23,5	22 - 25
mAb502	1,25	0,75 - 1,5	>100	>100
mAbs de IgG2a de camundongo de controle				
Anti-PorA P1.7	0,5	0,3 - 0,7	1,05	1,0 - 1,1
Anticapsular, SEAM 12	0,18	0,15 - 0,2	1,15	1,0 - 1,2

*Dados são médias e as respectivas faixas das concentrações dos mAbs que deram 50% de matança após 1 h de incubação com complemento (BC_{50%}) em dois ensaios independentes. Para complemento repleto de fH, 50 µg/ml de fH foram adicionados.

[000298] Eliminação da ligação de fH a NspA intensifica a atividade bactericida dos mAbs de anti-fHbp JAR 3 e JAR 5, mas não mAb502. Quanta mais baixa as concentrações de mAbs de anti-fHbp requeridas para bacteriolise com complemento depletado de fHs que repleto de fH sugeriu que quando fH estivesse presente, a inibição da ligação de fH através de JAR 3 ou JAR 5 foi incompleta (por exemplo, por causa da ligação de fH por um segundo ligante meningocócico tal como NspA (Lewis et al. (2010) *PLoS Pathog.* 6:e1001027). Para investigar a ligação de fH independente da ligação ao ligante de fHbp, a ligação de fH foi medida com um mutante isogênico da cepa do grupo B H44/76, em que o gene que codifica fHbp tinha sido inativado (cepa fHbp KO). Um segundo mutante em que ambos os genes fHbp e NspA tinham sido inativos serviu como um controle para um possível efeito contribuinte de NspA.

[000299] Por citometria de fluxo, os dois mutantes e a cepa parental mostraram respectiva ligação similar com um mAb de anti-PorA P1.7 murino de controle (Figura 40, PAINEL A). Como esperado, houve

muito menos ligação de fH (100 µg/ml) com o mutante de fHbp KO que com a cepa WT (comparar linha preta com a linha cinza na Figura 40, PAINEL B). Na ausência da expressão de fHbp e de NspA (linha pontilhada), ligação de fH foi indistinguível das bactérias WT de controle negativo sem fH adicionado (histograma preenchido de cinza claro). Respectivos resultados similares foram obtidos quando 20% de soro humano depletado de IgG que foram usados como a fonte de fH (Figura 40, PAINEL C).

[000300] Figuras 40A-C. Ligação de fH a mutantes do grupo B H44/76 com inativação genética da expressão de fHbp ou expressão de fHbp e NspA. A. MAb de anti-PorA (P1.7, 20 µg/ml). Linha preta, WT; linha cinza, fHbp KO; linha pontilhada, fHbp KO combinada com NspA KO. B. Ligação de fH humano purificado (100 µg/ml). Designação como no painel A. C. Ligação de fH em soro humano (20%, depletado de IgG). Designação como no Painel A. Os resultados foram replicados em dois ensaios independentes.

[000301] Para determinar uma possível contribuição da ligação de fH a NspA (e infrarregulação correspondente da ativação do complemento) para as concentrações de mAb de anti-fHbp altas requeridas para bacteriolise na presença de fH, atividade bactericida de anti-fHbp foi medida com um mutante de NspA KO isogênico (Figura 41). Com JAR 3 ou JAR 5 quimérico, que inibiram a ligação de fH à fHbp, houve manutenção significativamente maior do mutante de NspA KO que a cepa WT de controle (Figura 41, PAINÉIS A e B, respectivamente). Em contraste, mAb502 quimérico, que não inibiu a ligação de fH não teve nenhuma atividade bactericida contra qualquer cepa (Figura 41, PAINEL C). Dois mAbs de camundongo de controle, anti-PorA e anticapsular, mostraram respectiva atividade bactericida similar contra as cepas de NspA KO WT e mutantes (Figura 41, Painéis D e E, respectivamente).

[000302] Figuras 41A-E. Atividade bactericida de mAbs de anti-fHbp

medida contra um mutante do grupo B H44/76 com inativação genética da expressão de NspA. Sobrevivência das bactérias após incubação por 60 min a 37°C com cada um dos mAbs e 20% de soro humano depletado de IgG como uma fonte de complemento. Triângulos vazios, mutante de NspA KO; triângulos cheios, cepa WT de controle. A. JAR 3 quimérico. B. JAR 5 quimérico. C. MAb502 quimérico. D. mAb murino de anti-Por A de controle (P 1.7). E. mAb murino de controle, SEAM 12, reativo com a cápsula do grupo B. Resultados são de três diluições independentes dos mAbs executadas em dois experimentos. Onde indicado, a respectiva sobrevivência para cepas WT e NspA KO incubadas em diluição de mAb foi significativamente diferente (* $P \leq 0,02$; ** $P < 0,001$).

[000303] *Importância de ligar fH através de fHbp na atividade bactericida de mAb de anti-NspA.* Como observado acima, usando um mutante de NspA KO da cepa do grupo B H44/76, os dados mostraram que na ausência de fH ligado a NspA, os mAbs de anti-fHbp que inibiram a ligação de fH (JAR 3 ou JAR 5) tiveram maior atividade bactericida que quando testados contra uma cepa do tipo selvagem com expressão de NspA. O experimento reverso foi também conduzido: um mAb de anti-NspA AL12 (Moe et al, *Infect. Immun.* (2002) 70:6021) foi testado contra um mutante geneticamente silenciado de fHbp de uma cepa do grupo A (Senegal 1/99). Como mostrado na Figura 42, o mutante de fHbp KO foi 50 vezes mais suscetível em matar pelo mAb de anti-NspA que pela cepa WT. Em contraste, não havia nenhuma suscetibilidade intensificada significativa do mutante de fHbp KO para matar por um mAb de controle a PorA P1.9. Atividade bactericida dos mAbs foi medida com complemento humano (soro humano depletado de IgG).

[000304] Dados adicionais que a inibição de fH através de anticorpos de anti-fHbp é importante para a atividade bactericida. Oito de nove isolados africanos meningocócicos testados eram suscetíveis à atividade bactericida de um antissoro de camundongos imunizados com

uma vacina protótipo da vesícula de membrana externa nativa (NOMV) preparada de um mutante da cepa do grupo B H44/76 com supraexpressão de fHbp ID 1 (TABELA 11). Em contraste, todos os nove isolados eram resistentes ao antissoro de camundongos imunizados com a vacina de fHbp ID 1 recombinante (titulações bactericidas < 1:10), e apenas um dos nove isolados foi morto pelo antissoro de controle de camundongos imunizados com a vacina de NOMV do mutante de fHbp KO (X5, titulação 1:36). Misturando o antissoro de fHbp KO de NOMV com o antissoro para a vacina de fHbp ID 1 recombinante não aumentou a atividade bactericida contra quaisquer das cepas de teste (Tabela 11). Desse modo, os anticorpos de anti-fHbp suscitados pela vacina de NOMV com fHbp supraexpressa pareceram ser responsáveis pela atividade bactericida contra o isolado com variantes de sequência de fHbp que não parearam com fHbp ID 1 na vacina de NOMV. Também não houve nenhuma evidência da atividade bactericida cooperativa entre os anticorpos para fHbp e anticorpos para outros antígenos na vacina de NOMV.

TABELA 11. Atividade bactericida de soros de camundongos imunizados com uma vacina de vesícula de membrana externa nativa da cepa do grupo B H44/76 com fHbp ID 1 supraexpressa.

Cepa de Teste (fHbp ID)*	Vacina de fHbp recombinante		Vacina de NOMV	
	1/Titulação de soro		1/Titulação de soro	
	FHbp homóloga*	fHbp ID 1	fHbp KO	FHbp ID 1 supraexpressa
A3 (ID 5)	<10	<10	<10	132
A14 (ID 5)	<10	<10	<10	114
W1 (ID 9)	<10	<10	<10	<10
W3 (ID 9)	818	<10	<10	43
X3 (ID 74)	12204	<10	<10	574
X5 (ID 74)	4066	<10	36	640
X7 (ID 74)	7680	<10	<10	324

Cepa de Teste (fHbp ID)*	Vacina de fHbp recombinante		Vacina de NOMV	
	1/Titulação de soro		1/Titulação de soro	
	FHbp homóloga*	fHbp ID 1	fHbp KO	FHbp ID 1 supraexpressa

*Cepas A3 e A14 são grupo capsular A, W1 e W3 são grupo capsular W-135, e X3, X5 e X7 são grupo capsular X; Todas as cepas eram isolados clínicos de pacientes com doença meningocócica da África sub-saariana

Atividade bactericida (complemento humano) de soros armazenados de camundongos imunizados em um estudo previamente publicado (Koeberling Vaccine 2007, supra) com vacinas recombinantes de fHbp ou de NOMV preparadas de mutantes da cepa do grupo B H44/76 com fHbp ID 1 supraexpressa. Titulações são medias da diluição de soro para 50% de diminuição em CFU/ml após a incubação de uma hora com complemento humano conforme medida em pelo menos dois ensaios independentes.

**Titulação com a respectiva vacina de fHbp recombinante ID 5, 9 ou 74 daquela da cepa de teste

[000305] *A atividade bactericida de anti-fHbp reativa cruzada de soro ampla induzida pela vacina de NOMV mutante está associada com as respostas de anticorpo de anti-fHbp mais altas e maior bloqueio de ligação de fH à fHbp que a vacina de fHbp recombinante.* Por ELISA, os camundongos imunizados com a vacina de NOMV do mutante com fHbp ID 1 supraexpressa tiveram concentrações de anticorpo de anti-fHbp ID 1 de soro mais altas concentrações de anticorpo que os camundongos imunizados com a vacina de fHbp ID 1 recombinante (respectivas médias geométricas de 2203 e 746 U/ml, $P < 0,02$, Figura 43, Painel A). Por ELISA, os soros dos camundongos imunizados com a vacina de NOMV mutante também mostraram maior inibição de ligação de fH à fHbp ID 4, que foi a variante de sequência expressa pelas cepas do grupo A (Figura 43, Painel B, $P < 0,05$ em cada diluição testada). A inibição de fH aumentada não foi só um resultado das concentrações de anti-fHbp de soro mais altas no grupo de vacina de NOMV mutante uma vez que em média a concentração de anticorpo de anti-fHbp requerida para inibição de fH neste grupo foi quase 4 vezes mais baixa que no grupo de vacina de fHbp ID 1 recombinante (respectivas médias geo-

métricas de 1,17 vs. 4,04 U/ml, $P < 0,05$, Figura 43, Painel C).

[000306] Figura 43, PAINEL A. Respostas de anticorpo de anti-fHbp à vacinação conforme medida por ELISA (Painel A), e a habilidade dos anticorpos de anti-fHbp de soro para inibir a ligação de fH à fHbp (Painéis B e C, também por ELISA). Os camundongos foram imunizados com vacina de fHbp ID 1 recombinante (triângulos cheios), ou vacinas de NOMV preparadas de mutantes da cepa do grupo B H44/76 com supraexpressão de fHbp ID 1 (círculos abertos) ou um silenciamento genético de fHbp (círculos cheios). Para a vacina de fHbp recombinante e a vacina de NOMV com fHbp ID 1 supraexpressa, cada símbolo (Painel A e C) representa o resultado de um camundongo individual (10 camundongos por grupo de vacina). Para a vacina de fHbp KO de NOMV, cada símbolo representa os resultados do teste dos soros agrupados a partir de 3 a 4 animais individuais. A) Concentrações de anticorpo de anti-fHbp ID 1 em unidades arbitrárias por ml. Grupo de vacina de NOMV OE teve concentração de média geométrica mais alta (linha horizontal) que os camundongos imunizados com a vacina de fHbp recombinante ($p=0,02$). B) Inibição da ligação de fH a fHbp ID 4, que foi heterólogo à fHbp ID 1 nas vacinas. Em todas as diluições, a atividade inibidora média do grupo dado a vacina de NOMV do mutante com fHbp supraexpresso (círculos abertos) foi mais alta que o grupo de vacina de fHbp recombinante (triângulos cheios; $p < 0,05$). C) Concentração de anticorpo de anti-fHbp ID 1 de soro para 50% de inibição da ligação de fH a fHbp ID 4 (96% de identidade de aminoácido com ID 1). A concentração de anticorpo de anti-fHbp da média geométrica para 50% de inibição da ligação de fH foi mais baixa para o grupo de fHbp de NOMV OE (círculos abertos) que o grupo de vacina de fHbp recombinante (triângulos cheios, $p < 0,05$).

[000307] Embora a presente invenção tenha sido descrita com referência às suas modalidades específicas, deveria ser entendido por

aqueles versados na técnica que várias alterações podem ser feitas e equivalentes podem ser substituídos sem abandono do verdadeiro espírito e escopo da invenção. Além disso, muitas modificações podem ser feitas para adaptar uma situação particular, material, composição de substância, processo, etapa ou etapas do processo, ao objetivo, espírito e escopo da presente invenção. Todas tais modificações são intencionadas estar dentro do escopo das reivindicações anexadas aqui.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de que compreende uma proteína de ligação ao fator H de ocorrência não natural (fHbp) derivada de fHbp ID1 tendo a sequência de acordo com a SEQ ID NO: 1 e é uma fHbp da subfamília B, em que fHbp de ocorrência não natural tem uma substituição de aminoácido na posição R41, baseada na numeração de SEQ ID NO: 1, e em que a referida fHbp de ocorrência não natural tem uma afinidade mais baixa para o fator H humano (fH) do que o fHbp ID1 e desencadeia anticorpos bactericidas contra *N. meningitidis*;

em que a substituição de aminoácidos em R41 é R41S ou R41A; ou

em que a composição compreende um adjuvante selecionado de hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, MF59™, uma emulsão de óleo em água, monofosforil lipídeo A ou uma saponina; ou

em que a composição compreende vesículas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* geneticamente modificadas para expressar fHbp; ou

em que a composição compreende microvesículas de *Neisseria meningitidis* geneticamente modificadas para expressar o fHbp.

2. Proteína de ligação ao fator H de ocorrência não natural (fHbp) derivada de fHbp ID1 (tendo a sequência estabelecida na SEQ ID NO: 1) e é uma fHbp da subfamília B, caracterizada pelo fato de que a fHbp de ocorrência natural tem uma substituição de aminoácido na posição R41, baseada na numeração de SEQ ID NO: 1, cuja substituição é R41S ou R41A, e em que a referida fHbp de ocorrência não natural tem uma afinidade mais baixa para o fator H humano (fH) do que o fHbp ID1 e desencadeia anticorpos bactericidas contra *N. meningitidis*.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 1 ou fHbp,

de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que a sequência de aminoácidos de ocorrência não natural difere da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 apenas pela substituição R41A ou R41S.

4. Composição ou fHbp, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a referida fHbp de ocorrência não natural se liga ao fH humano com afinidade que não é mais do que cerca de 60% da afinidade do fHbp ID1 para o fH humano.

5. Composição ou fHbp, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que a substituição de aminoácido em R41 é R41S.

6. Composição ou fHbp, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que a substituição de aminoácido em R41 é R41A.

7. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 3 a 6, caracterizada pelo fato de que compreende um adjuvante selecionado de hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, MF59 TM, uma emulsão de óleo em água, monofosforil lipídeo A ou uma saponina.

8. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 3 a 6, caracterizada pelo fato de que compreende vesículas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* geneticamente modificadas para expressar a fHbp.

9. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 3 a 6, caracterizada pelo fato de que compreende microvesículas de *Neisseria meningitidis* geneticamente modificadas para expressar o fHbp.

10. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 3 a 9, caracterizada pelo fato de que é para uso para desencadear uma resposta de anticorpos em um mamífero, em que o

referido mamífero é um humano.

11. Composição, de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a referida resposta de anticorpos compreende a produção de anticorpos bactericidas contra *Neisseria meningitidis*.

12. Célula bacteriana geneticamente modificada, caracterizada pelo fato de que compreende a variante fHbp, como definida em qualquer uma das reivindicações 2 a 6.

13. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 3 a 9, ou fHbp, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 6, caracterizada pelo fato de que é para uso na prevenção da doença de *Neisseria*.

14. Uso de uma composição imunogênica fHbp, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 ou 3 a 9, ou de uma fHbp, como definida em qualquer uma das reivindicações 2 a 6, caracterizado pelo fato de que é na preparação de um medicamento para desencadear uma resposta de anticorpos em um mamífero, em que o referido mamífero é um ser humano.

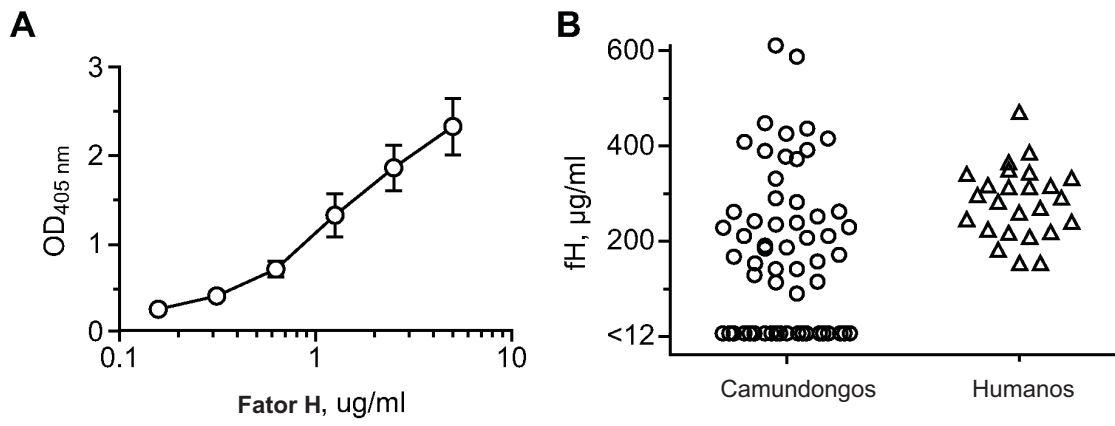


FIG. 1

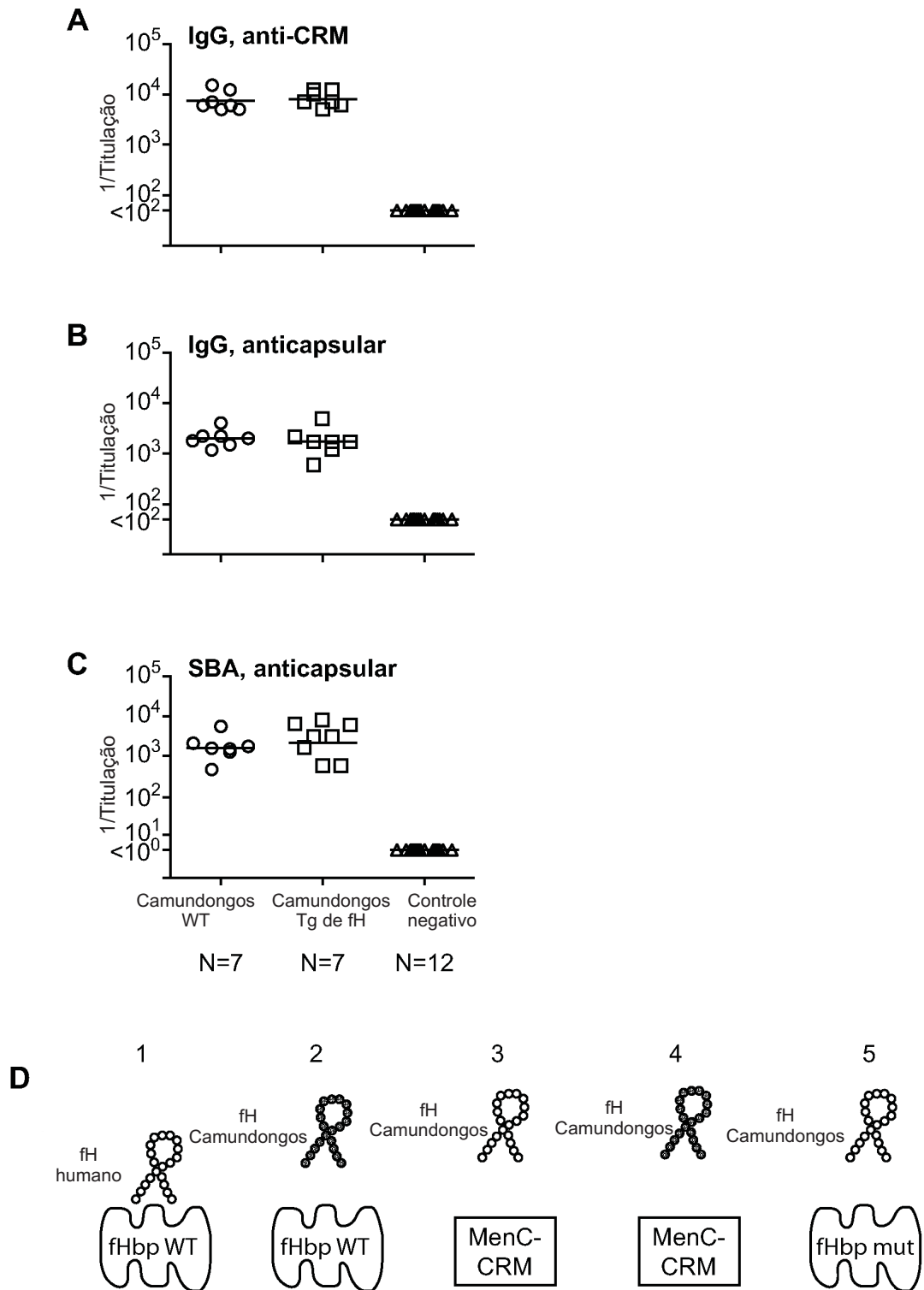


FIG. 2

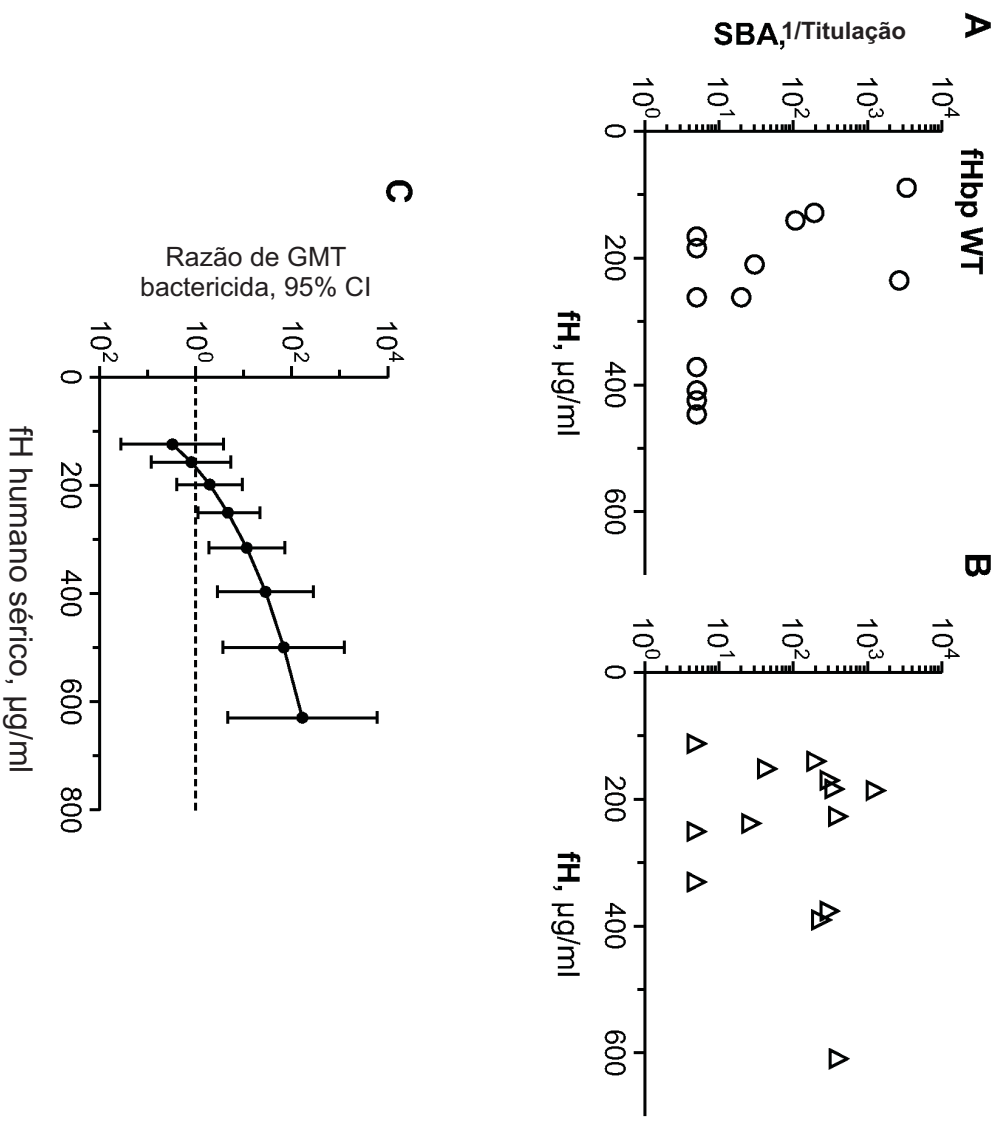


FIG. 3

Ligação de fH, JAR4 e JAR5 aos mutantes de fHbp ID 1 e do tipo selvagem

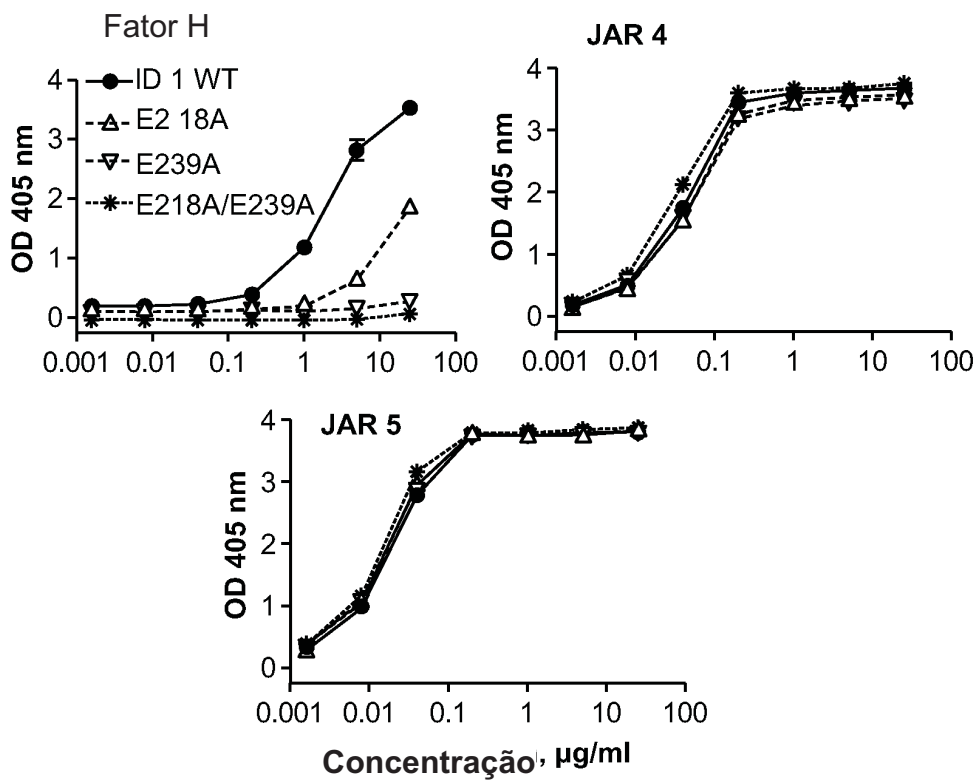


FIG. 4

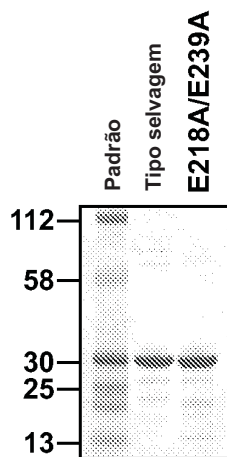


FIG. 5

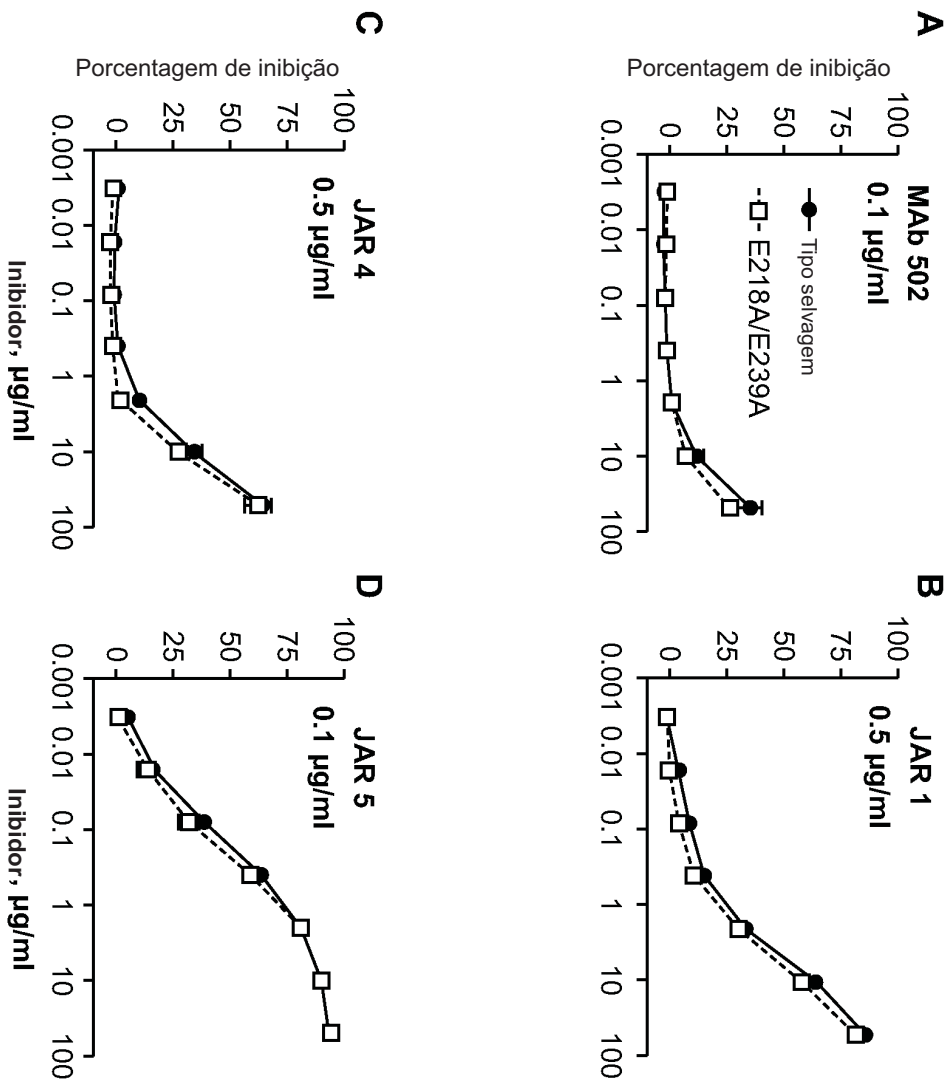


FIG. 6

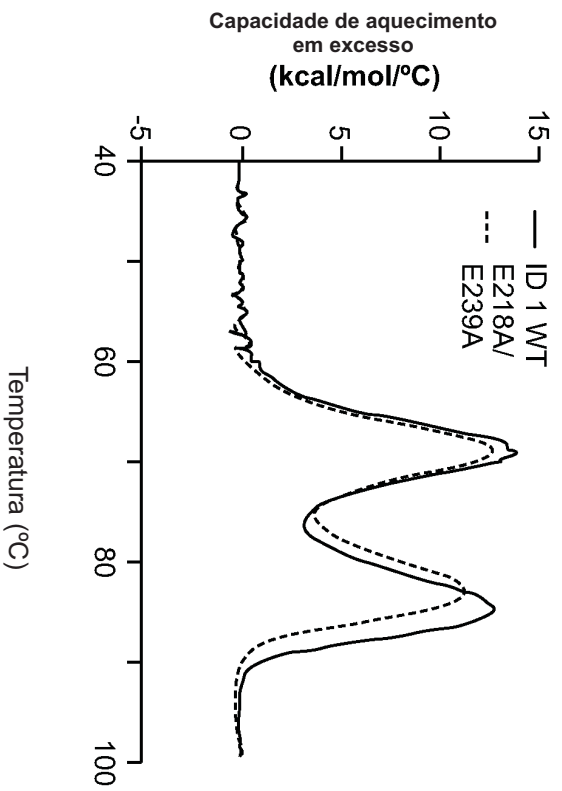


FIG. 7A

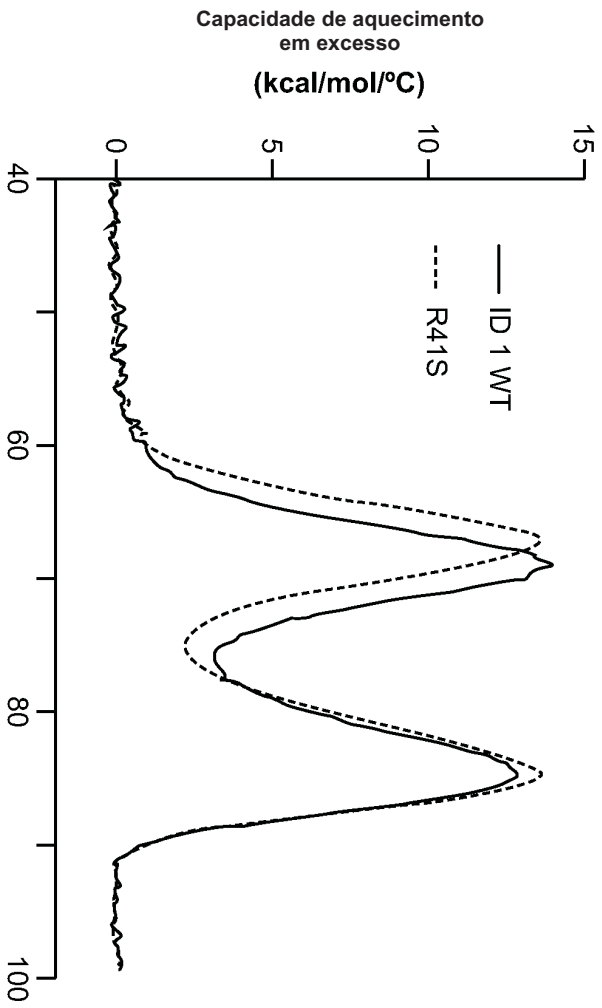


FIG. 7B

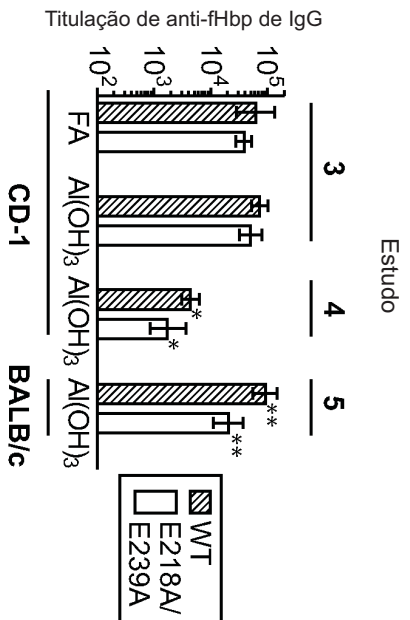
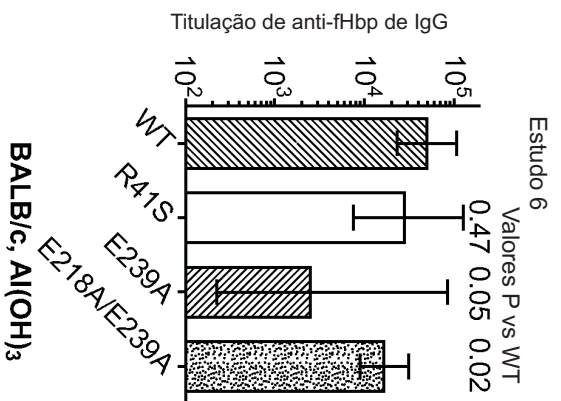


FIG. 7C



BALB/c, Al(OH)₃

FIG. 7D

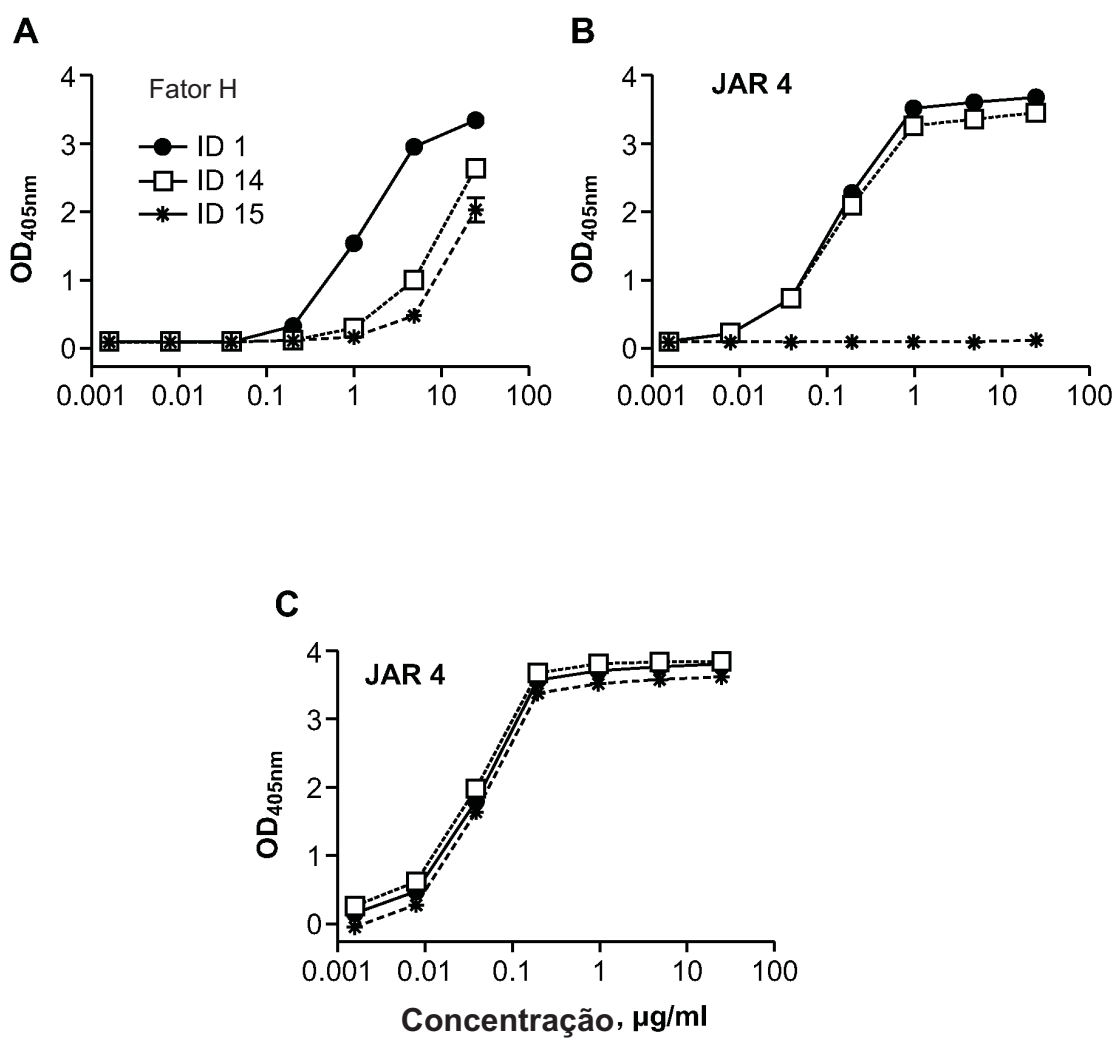


FIG. 8

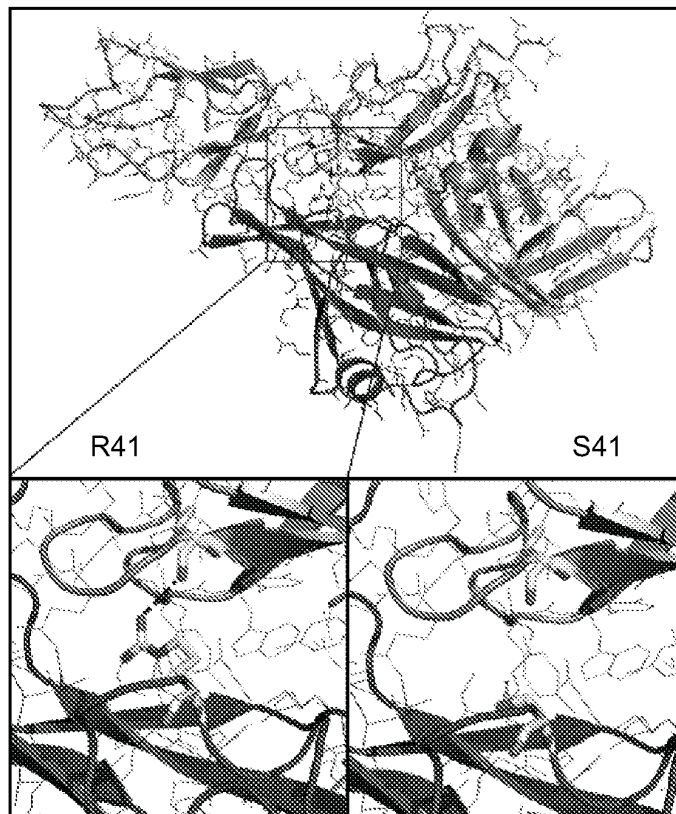


FIG. 9A

MRLAKIICLMLWAICVAEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLG 60
NVIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCGHPGDTPEFTTGTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQL 120
LGEINYRECDTDGWTNDIPICEVVKCLPVTAPENGKIVSSAMEPDREYHFGQAVRVCNS 180
GYKIEGDEEMHCSDDGFWSKEKPKCVEISCKSPDVINGSPI SQKIIYKENERFQYKCNMG 240
YEYSERGDVCTESGWRPLPSCEEKSCDNPIYPNGDYSPLRIKHRTGDEITYQCRNGFY 300
ATRGNTAKCTSTGWIPAPRCTLKPCDYDPIKHGGLYHENMRRPYFPVAVGKYYSYCD 360
FETPSGSYWDHIHCTQDGWSPAVPCLRKCYFPYLENGYNQNYGRKFVQGSIDVACHPGY 420
ALPKAQTTVTCMENGWSPTPRCIRVKTCSSKSSIDIENGFISESQYTYALKEKAKYQCKLG 480
YVTADGETSGSITCGKDGWSAQPTCIKSCDIPVFMNARTKNDFTWFKLNDTLDYCHDGY 540
ESNTGSTTGSIVCGYNGWSDLPICYERECELPKIDVHLPDRKKDQYKVGVLKFSCKPG 600
FTIVGPNSVQCYHFGLSPDLPICKEQVQSCGPPPELLNGNVKEKTKEEYGHSEVVEYYCN 660
PRFLMKGPNKIQCVDGWTTLPVCIVEESTCGDIPPELHGWAQLSSPPYYYGDSVEFNCS 720
ESFTMIGHRSITCIHGVTQLPQCVAIDKLLKCKSSNLIILEEHLKNKKEFDHNSNIRYR 780
CRGKEGWIHTVCINGRWDPEVNCSMAQIQLCPPPQIPNSHNMTTTLNIRDGKVSVLCQ 840
ENYLIQEGEEITCKDGRWQSIPLCVEKIPCSQPPQIEHGTINSSRSSQESYAHGTKLSYT 900
CEGGFRISEENETTCYMGKWSSPPQCEGLPCKSPPEISHGVVAHMSDSYQYGEVVTYKCF 960
EGFGIDGPAIAKCLGEKWSHPPSCIKTDCLSLPSFENAI PMGEKKDVYKAGEQVYTYTCAT 1020
YYKMDGASNVTCINSRWTGRPTCRDTSCVNPPTVQNAYIVSRQMSKYPSGERVRYQCRSP 1080
YEMFGDEEVMCLNGNWTEPPQCKDSTGKCGPPPIIDNGDITSFPLSVYAPASSVEYQCQN 1140
LYQLEGNKRITCRNGQWSEPPKCLHPCVISREIMENYNIALRWTAKQKLYSRTGESVEFV 1200
CKRGYRLSSRSHLRTTCWDGKLEYPTCAKR 1231 (SEQ ID NO:9)

FIG. 9B

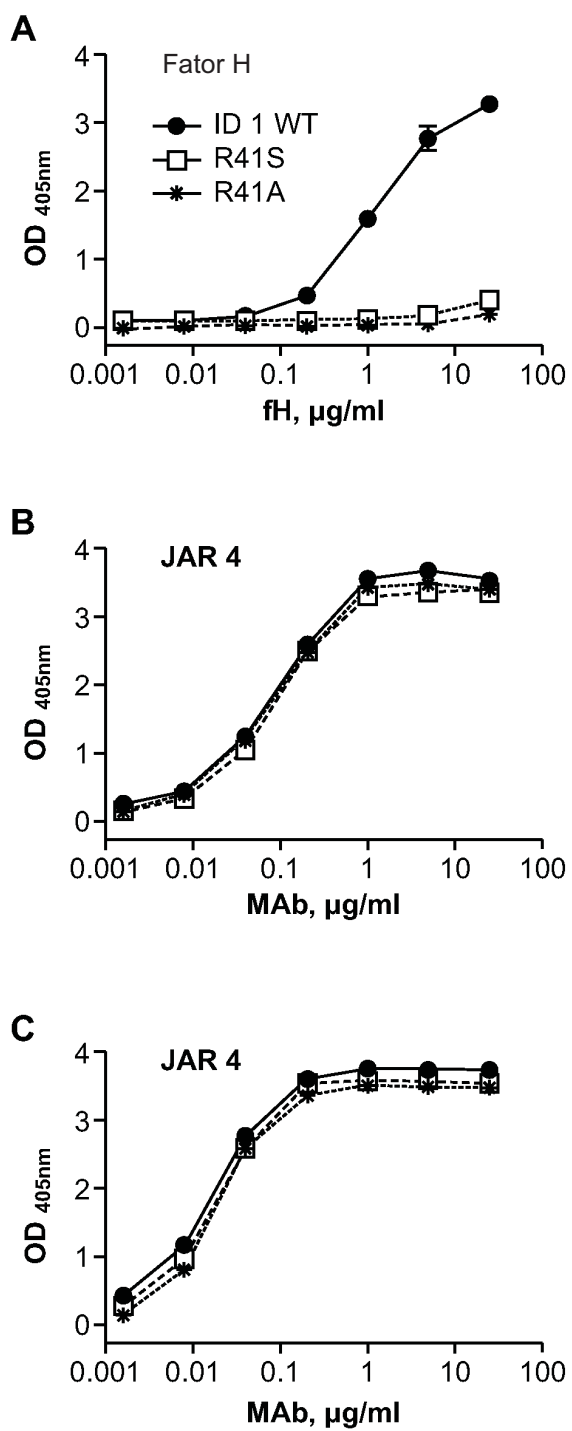


FIG. 10

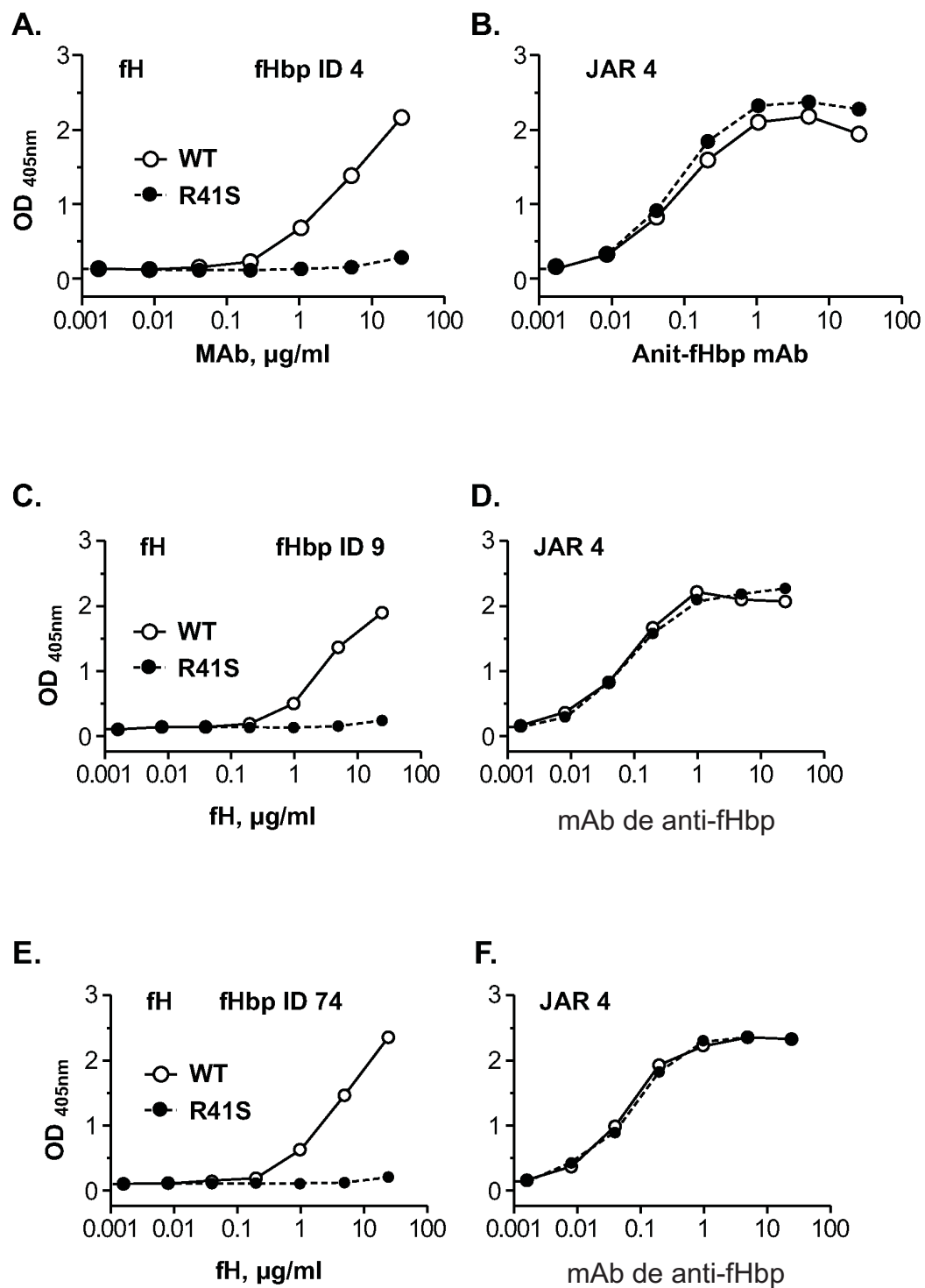


FIG. 11

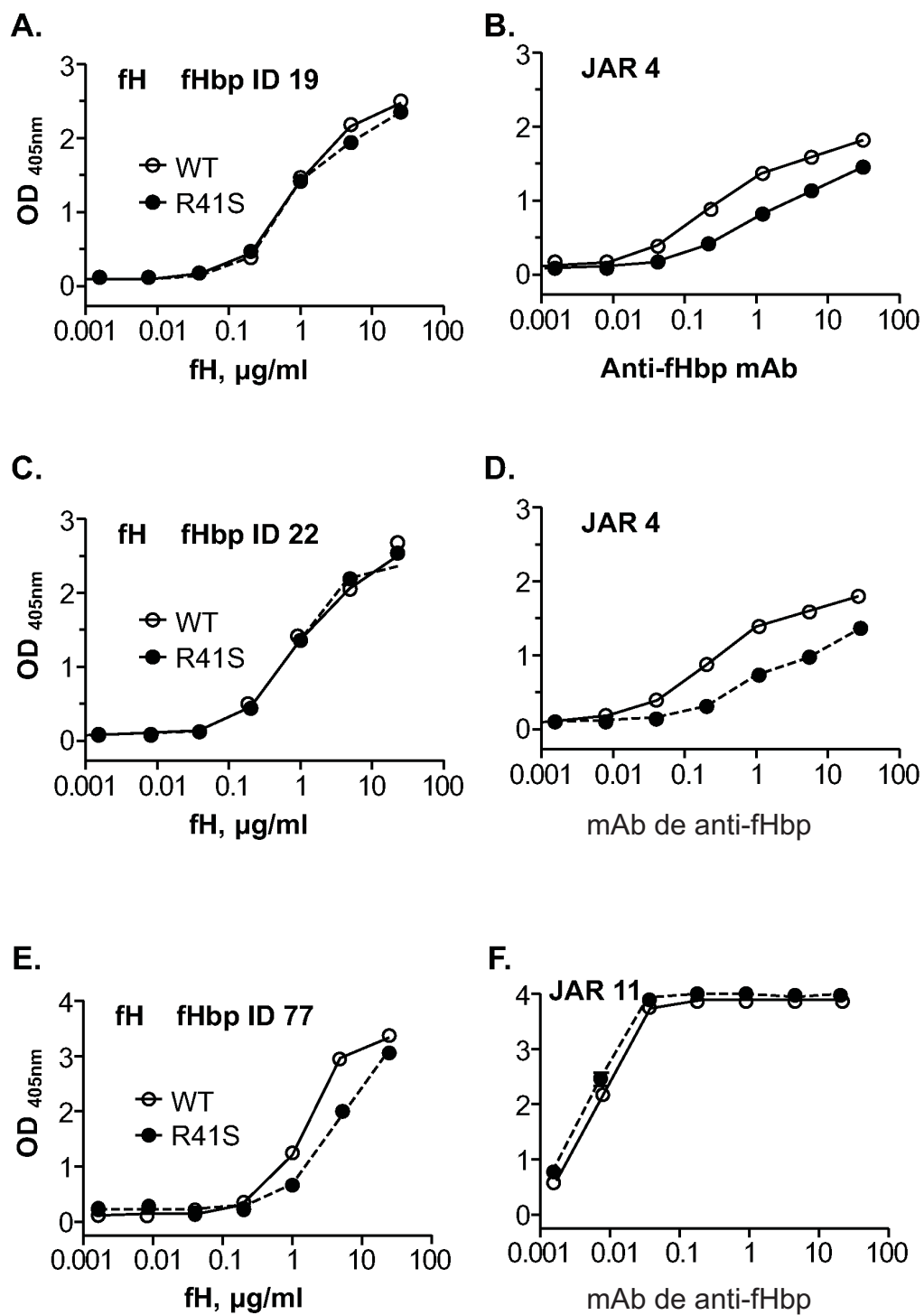


FIG. 12

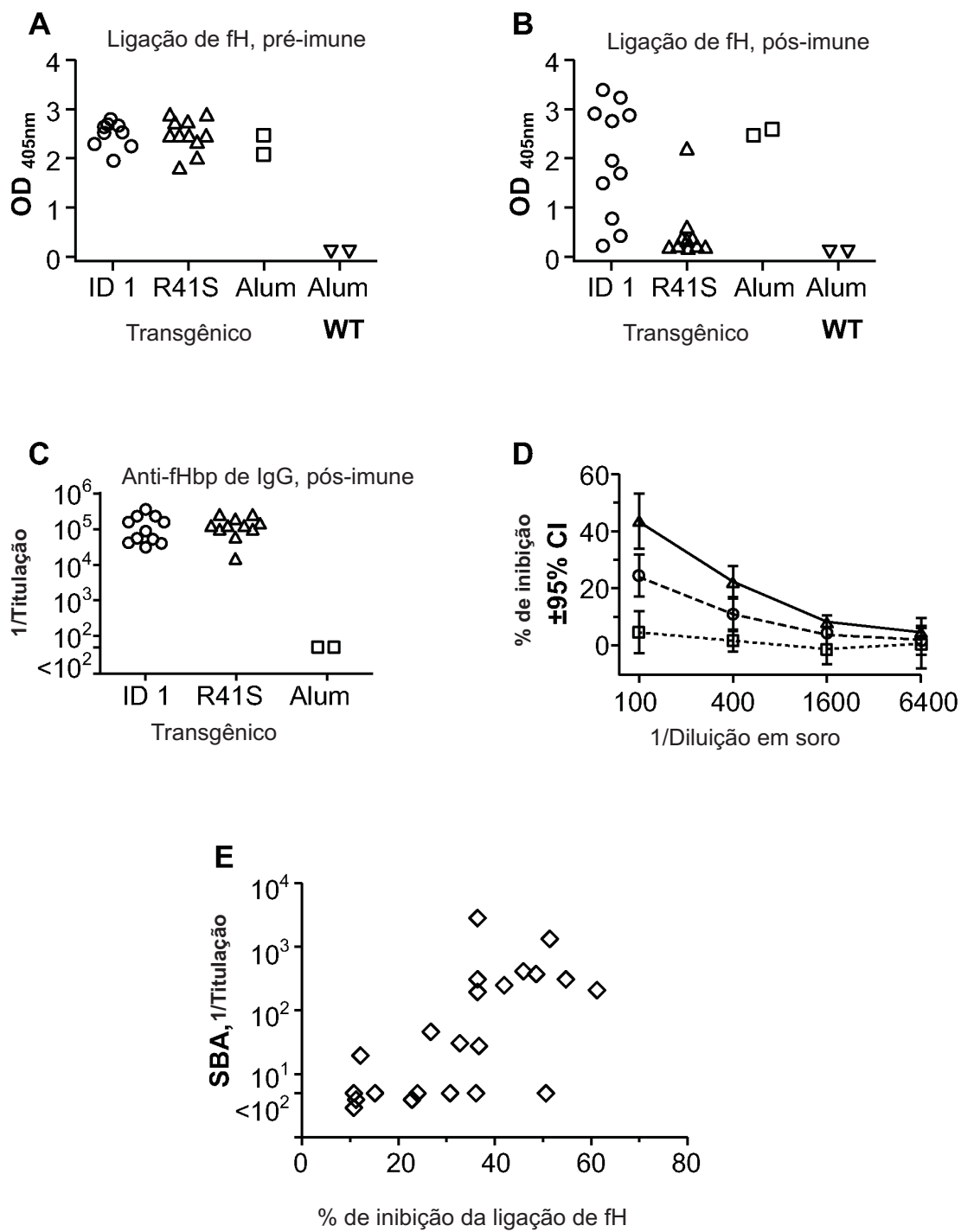
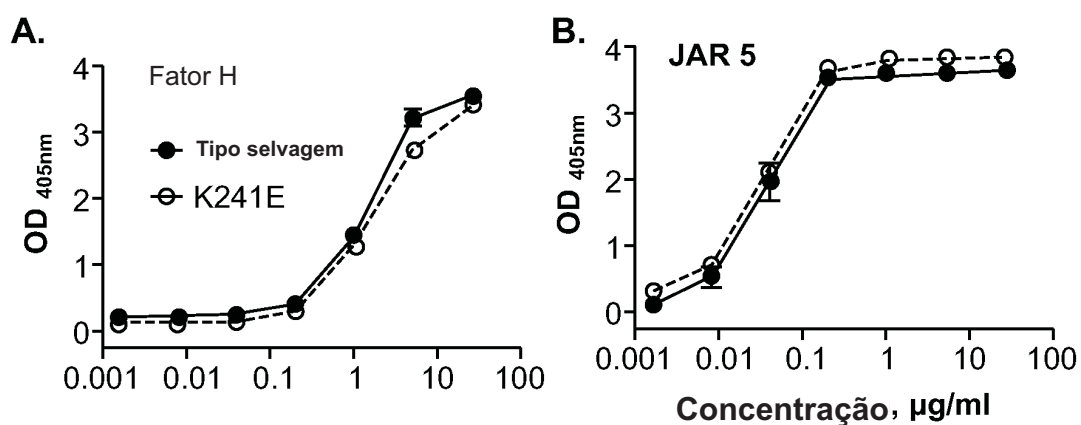


FIG. 13

Ligação de fH e JAR5 à fHbp ID 1 do tipo selvagem e mutante



Ligação de fH e JAR5 à fHbp ID 15 do tipo selvagem e mutante

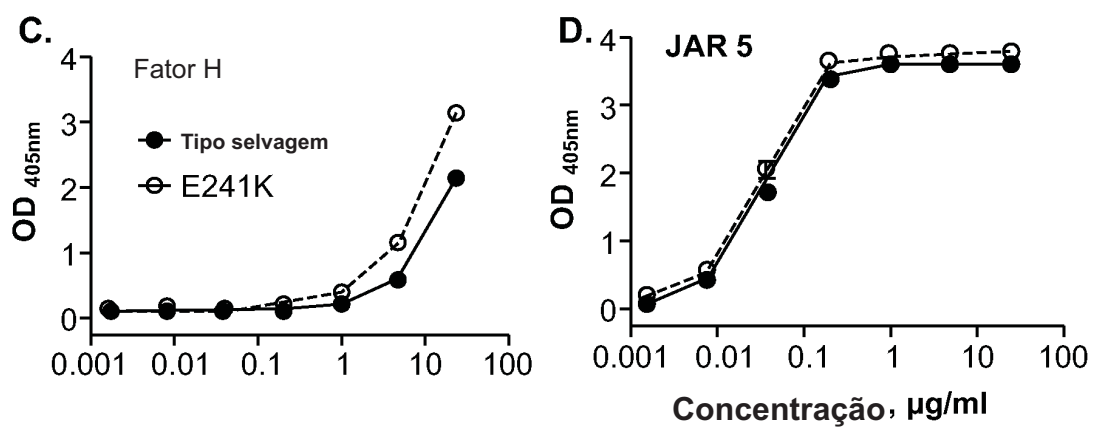


FIG. 14

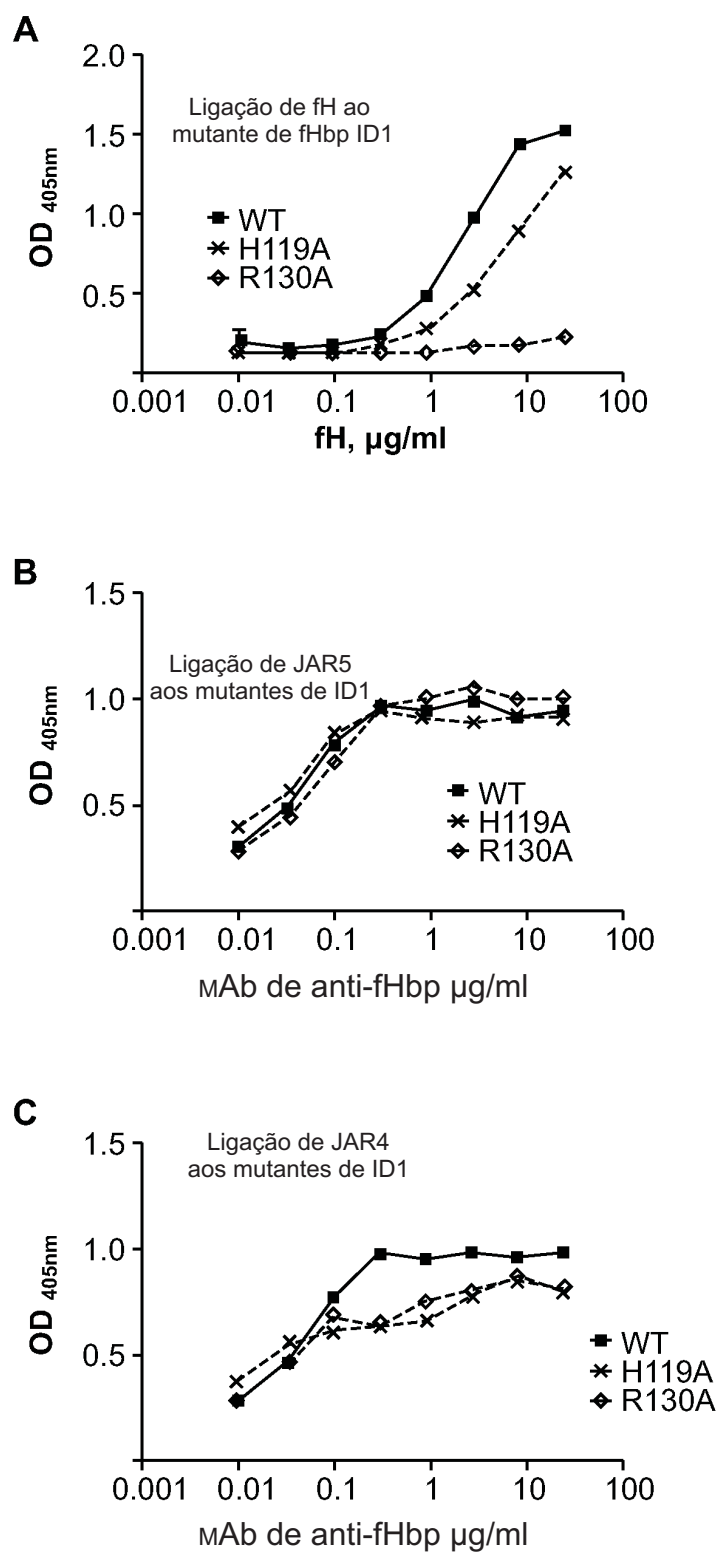


FIG. 15

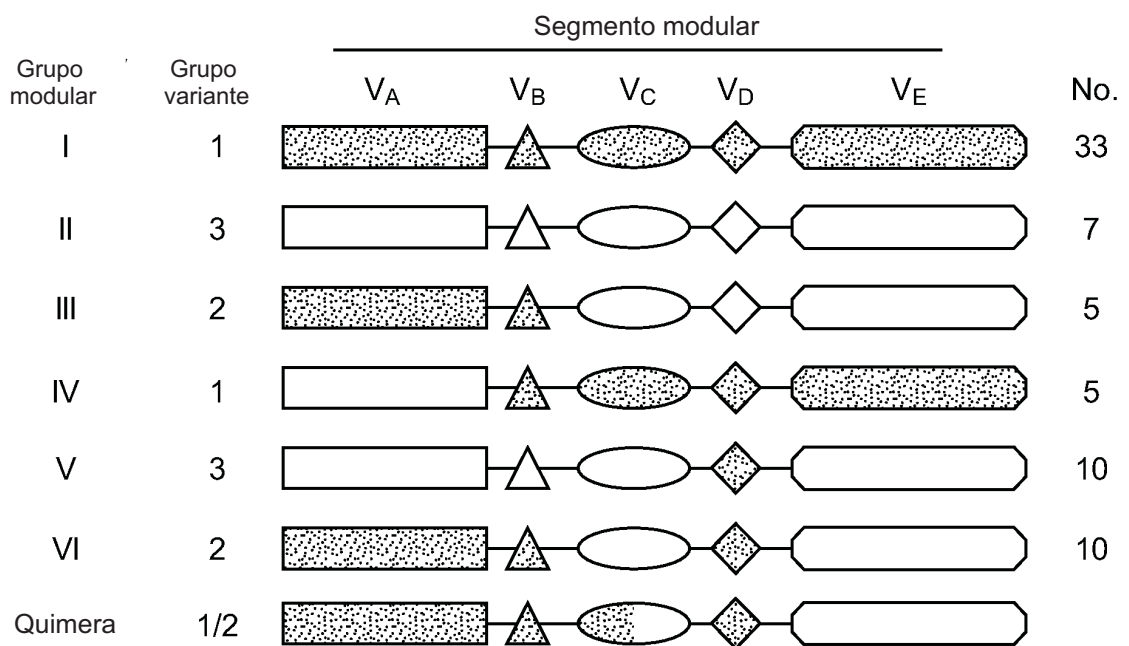


FIG. 16

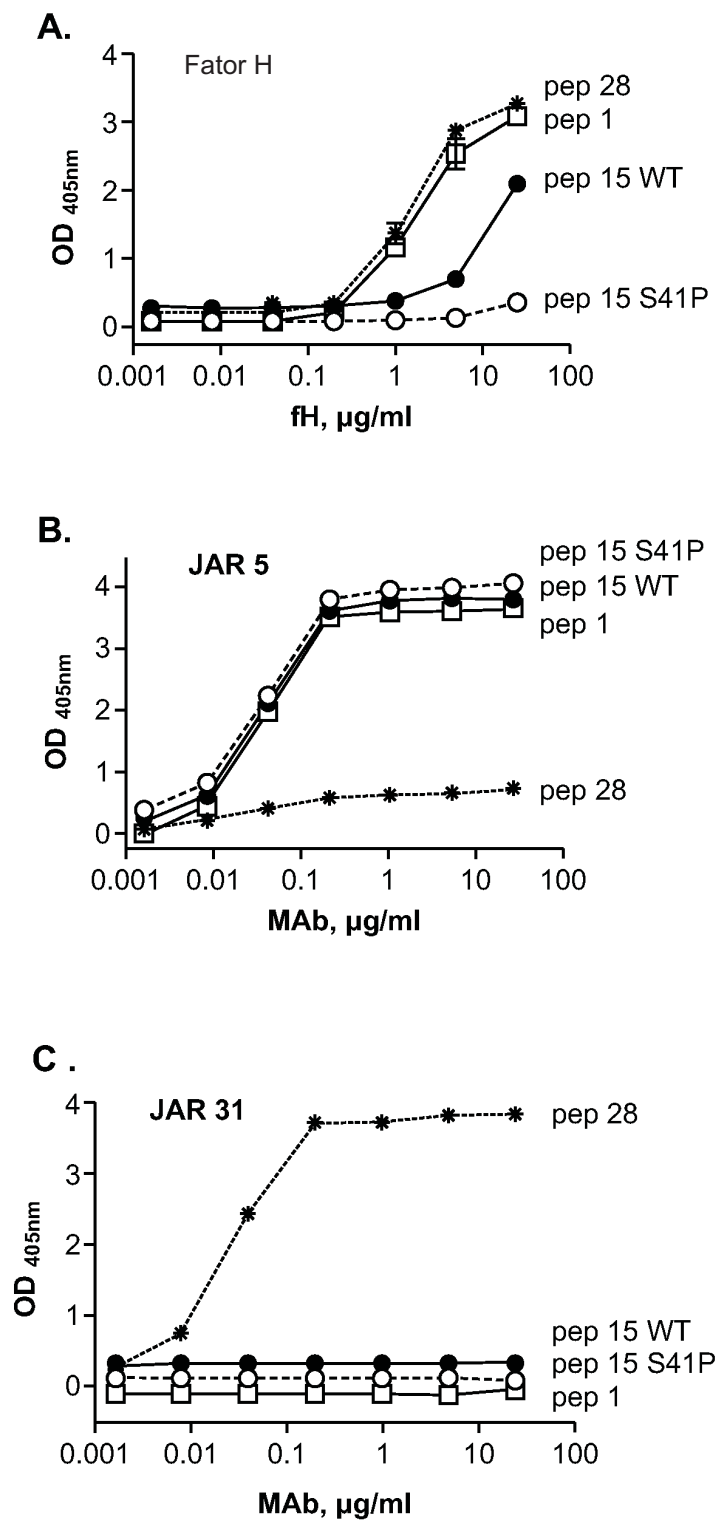


FIG. 17

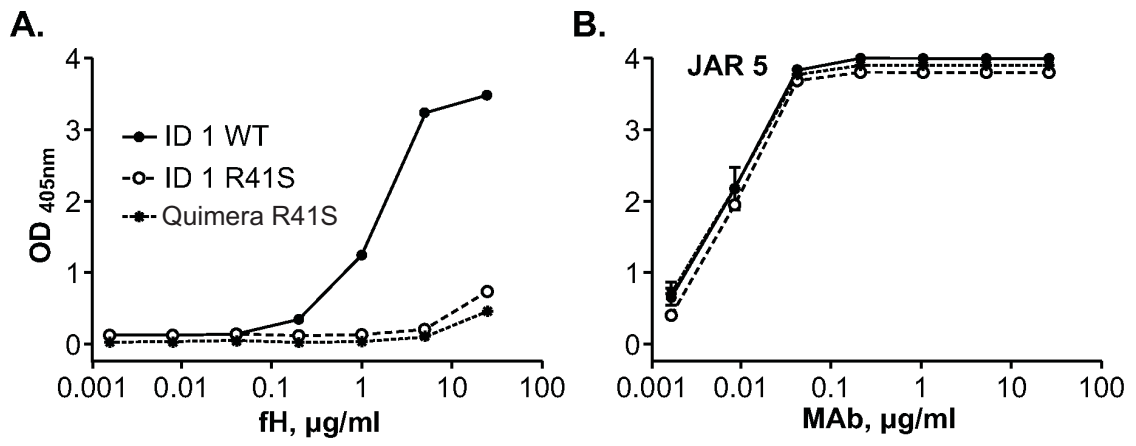


FIG. 18

A.

ID15 CSSGGGGSSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAE 55
ID1 CSSGGGG-----VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEK
Quimera CSSGGGG-----VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEK
ID77 CSSGGGG-----VAADIGARLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEK
ID28 CSSGGGGSSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQAQAEK
ID22 CSSGGGG-----VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEK

ID15 TFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRFDVFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTE
ID1 TYGNGD---SLNTGKLNKDKVSRFDVFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTE 112
Quimera TYGNGD---SLNTGKLNKDKVSRFDVFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTE
ID77 TYGNGD---SLNTGKLNKDKVSRFDVFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIE
ID28 TFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRFDVFQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIE
ID22 TYGNGD---SLNTGKLNKDKVSRFDVFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIE

ID15 QVQDSEHSGKMAKRVQFRIGDIVGEHTSFGKLPKDYMATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDF
ID1 QIQDSEHSGKMAKRVQFRIGDIAGEHTSFDKLEGGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDF 172
Quimera QIQDSEHSGKMAKRVQFRIGDIAGEHTAFNQLP-DGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDF
ID77 KINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLP-DGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDF
ID28 KINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLP-GGKAEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDF
ID22 KINNPDKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLP-SGKAEYHGKAFSSDDPNRGLHYSIDF

ID15 AAKQGGHGKIEHLKSPENVDLAAADIKPDEKHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQ
ID1 AAKQGGHGKIEHLKSPENVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQ 232
Quimera AAKQGGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQ
ID77 AAKQGGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQ
ID28 TKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEKGTYHLALFGDRAQ
ID22 TKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGSEKGTYHLALFGDRAQ

ID15 EVAGSAEIVETANGIRHIGLAAKQ 263 (SEQ ID NO:5)
ID1 EVAGSAEIVKTVNGIRHIGLAAKQ 255 (SEQ ID NO:1)
Quimera EIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ 254 (SEQ ID NO:8)
ID77 EIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ 254 (SEQ ID NO:4)
ID28 EIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ 262 (SEQ ID NO:3)
ID22 EIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ 254 (SEQ ID NO:2)

20/48

FIG. 19

B.
 (A1.2)
 ID 1 VAADIGAGIA DALITAPLDHK DKGLQSLTLD QSVRKNEKLLK LAAQGAEKTY GNGD---SLN TGKLNKNDKV (SEQ ID NO:28)
 ID 77 VAADIGARIA DALITAPLDHK DKGLQSLTLD QSVRKNEKLLK LAAQGAEKTY GNGD---SLN TGKLNKNDKV (SEQ ID NO:29)
 (A1.5)

C.
 ID 1 (C1.5) VYKQSHSALT AFQTEQIQDS EHSKGMVAKR QFRIGDIAGE HTSFDKLP**EG** GRATYRGTAFF (SEQ ID NO:30)
 ID 77 (C2.4) VYKQSHSALT **ALQTEQVQDS** EHSKGMVAKR QFRIGDI**VE** HTSFGKLPKD VMATYRGTAFF (SEQ ID NO:31)

D. ID	MG	VG	41	SEQ ID NO:
1	I	1	TAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQGAEKTYGNGD---SLNTGKLN	10
4	I	1	TAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQGAEKTYGNGD---SLNTGKLN	11
9	I	1	TAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQGAEKTYGNGD---SLNTGKLN	10
74	I	1	TAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQGAEKTYGNGD---SLNTGKLN	10
15	IV	1	TAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTITLSAQGAERTFKAGDKDNSLNTGKLN	12
55	IV	1	TAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTITLSAQGAEKTYGNGD---SLNTGKLN	13
22	III	2	TAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQGAEKTYGNGD---SLNTGKLN	11
19	VI	2	TAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQGAEKTYGNGD---SLNTGKLN	11
77	VI	2	TAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQGAEKTYGNGD---SLNTGKLN	11
28	II	3	TAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTITLSAQGAERTFKAGDKDNSLNTGKLN	14

FIG. 19 (Cont.1)

E. ID 1 (v.1) CSSGGGG--- --VAADIGAG LADALTAPLD HKDKGLQSLT LDQSVRKNEK LKLAAQGAEK 55
 ID 77 (v.2) CSSGGGG--- --VAADIGAR LADALTAPLD HKDKGLQSLT LDQSVRKNEK LKLAAQGAEK 55
Quimera 1 CSSGGGG--- --VAADIGAG LADALTAPLD HKDKGLQSLT LDQSVRKNEK LKLAAQGAEK 55

ID 1 TYNGND---S LNTGKLNNDK VSRFDFIRQI EVDGQLITLE SGEFQVYKQS HSALTAFQTE 112
 ID 77 TYNGND---S LNTGKLNNDK VSRFDFIRQI EVDGQLITLE SGEFQVYKQS HSALTAFQTE 112
Quimera TYNGND---S LNTGKLNNDK VSRFDFIRQI EVDGQLITLE SGEFQVYKQS HSALTAFQTE 112

ID 1 QIQDSEHSGK MVAKRQFRIG DIA GEHT SFD KLPEGGRATY RGTAFGSDDA GGKLYTIDF 172
 ID 77 KINPDKIDS LINGRFLY GIG GEHT AFN QLP-DGKAEY HGKAFSSDDA GGKLYTIDF 171
Quimera QIQDSEHSGK MVAKRQFRIG DIA GEHT AFN QLP-DGKAEY HGKAFSSDDA GGKLYTIDF 171

ID 1 AAKQNGNKIE HLKSPELNVD LAAADIKPDG KRHAVISGSV LYNQAEKGSY SLGIFGGKAQ 232
 ID 77 AAKQGHGKIE HLKTPEQNVE LAAAEKKADE KSHAVILGDT RYGSEEKGTY HLALFGDRAQ 231
Quimera AAKQGHGKIE HLKTPEQNVE LAAAEKKADE KSHAVILGDT RYGSEEKGTY HLALFGDRAQ 231

ID 1 EVAGSAEVKT VNGIRHIGLA AKQ 255 (SEQ ID NO:1)
 ID 77 EIAGSATVKI GEKVHEIGIA GKQ 254 (SEQ ID NO:4)
Quimera EIAGSATVKI GEKVHEIGIA GKQ 254 (SEQ ID NO:8)

FIG. 19 (Cont.2)

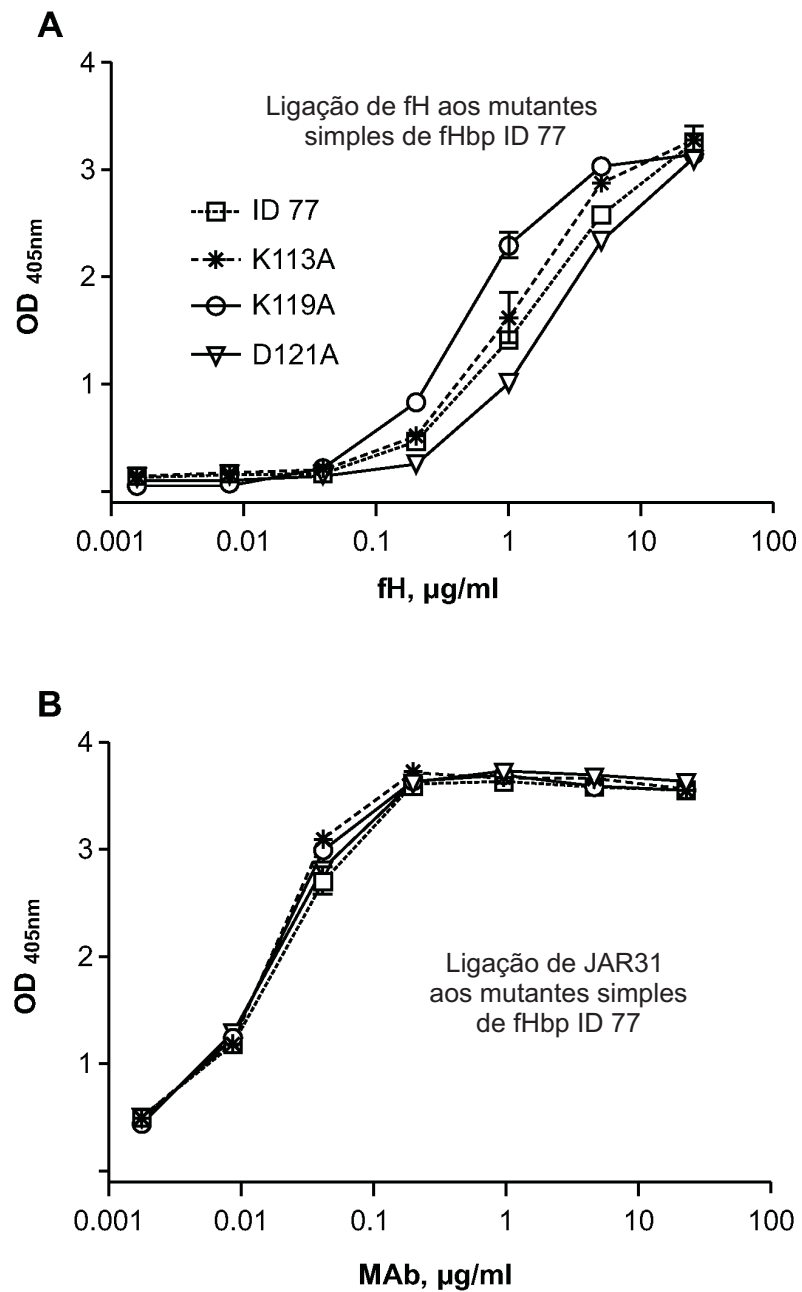


FIG. 20

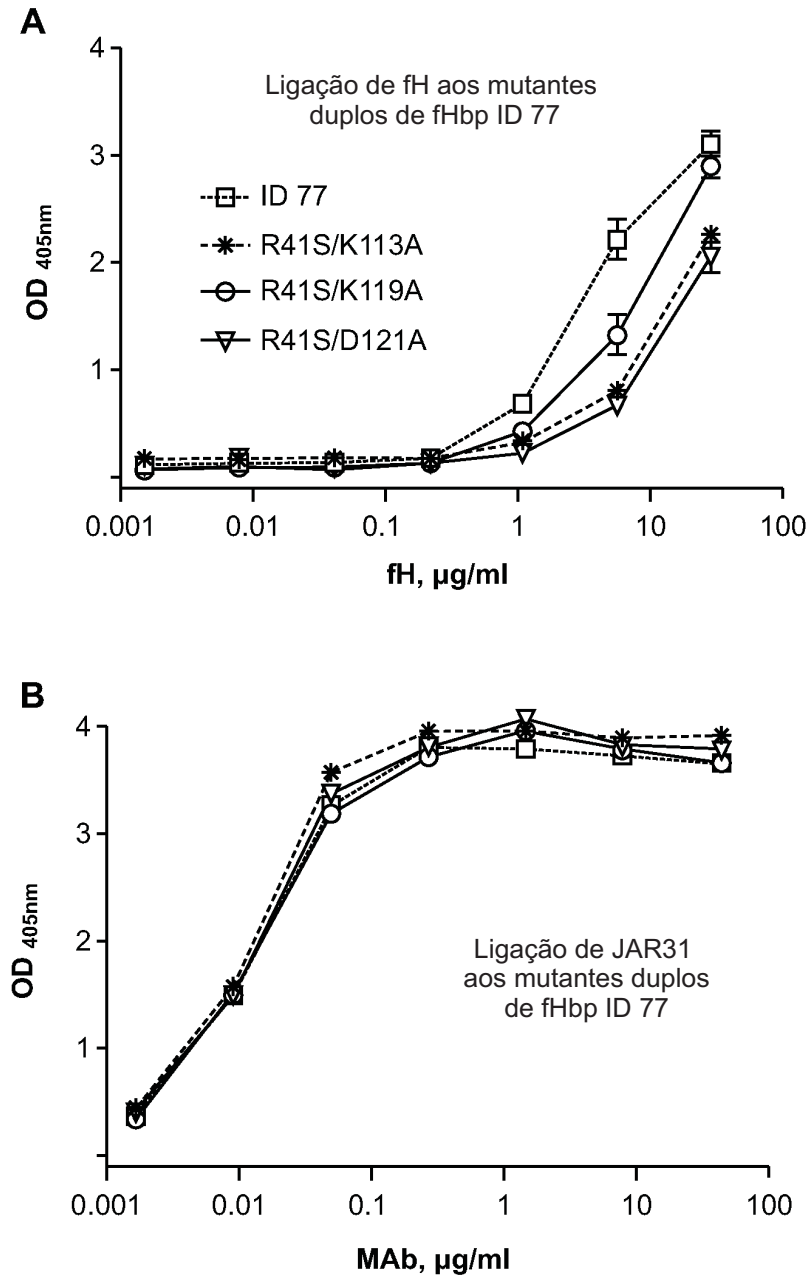


FIG. 21

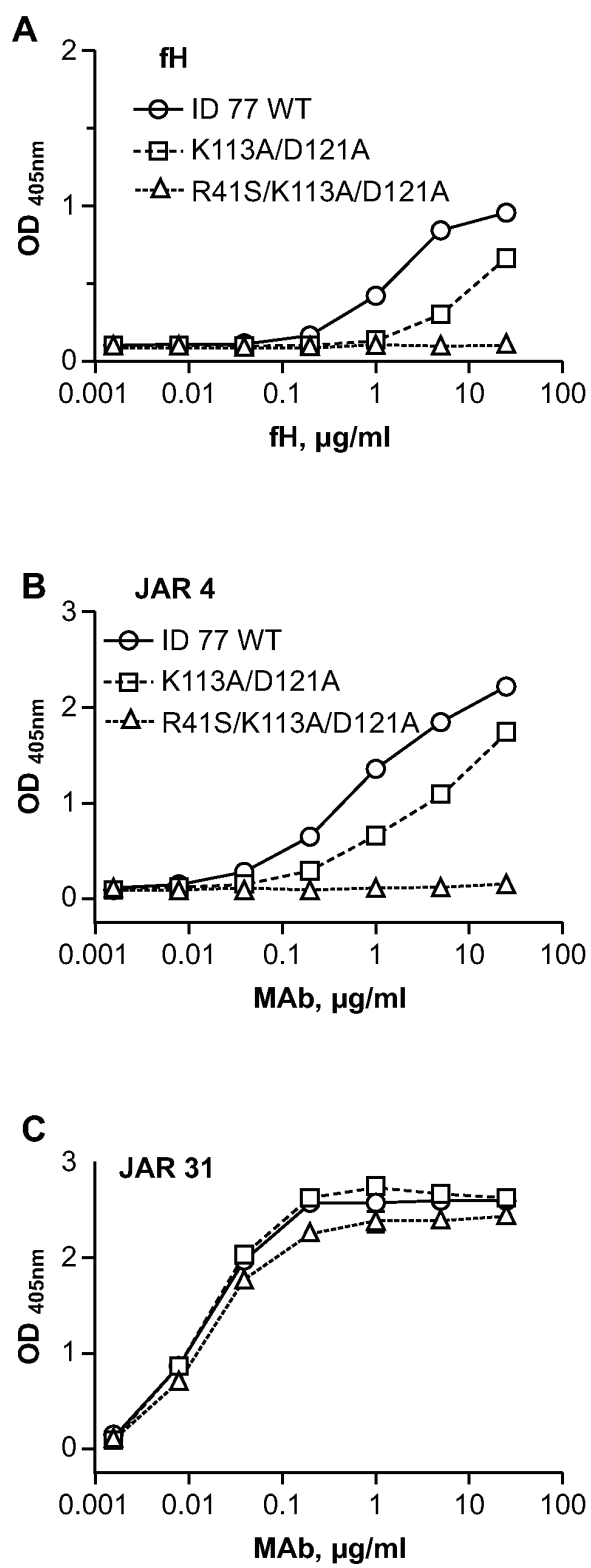


FIG. 22

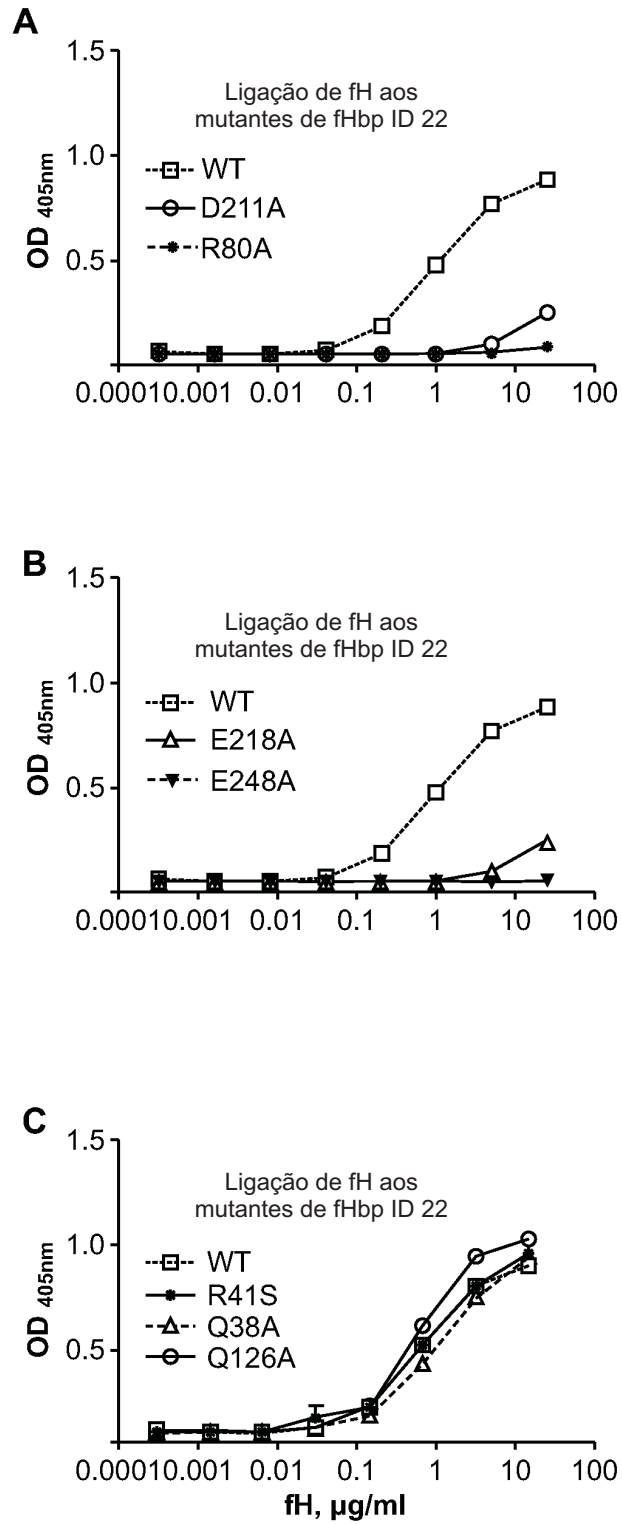
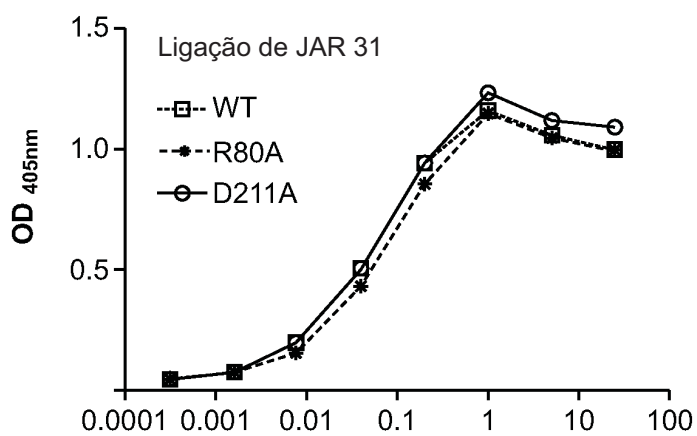


FIG. 23

Ligação de JAR 31 aos mutantes de fHbp ID 22 e do tipo selvagem

Painel A



Painel B

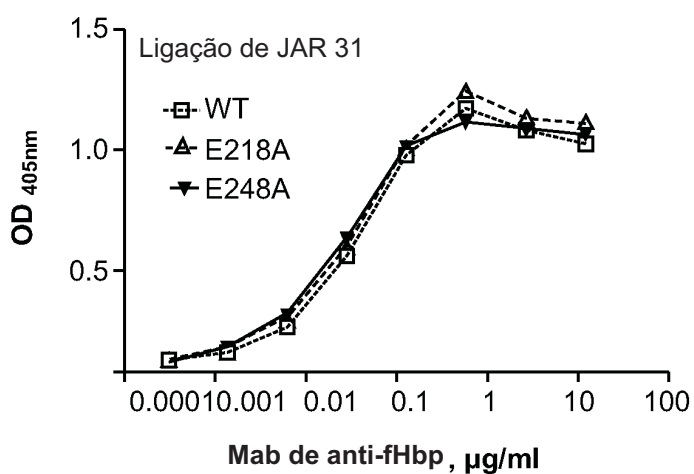
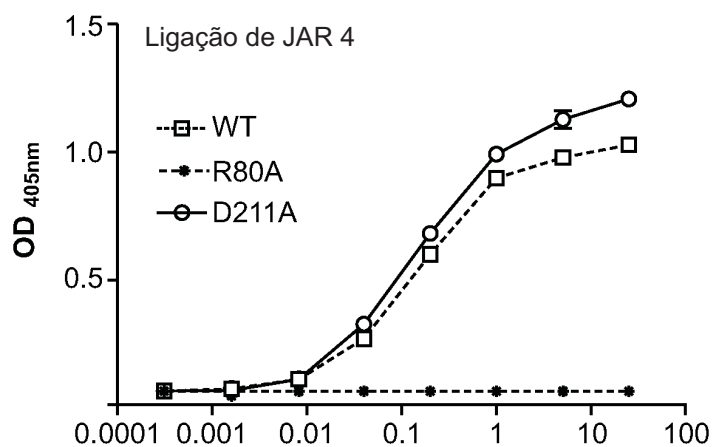


FIG. 24

Ligação de JAR 4 aos mutantes de fHbp ID 22 e do tipo selvagem

Painel A



Painel B

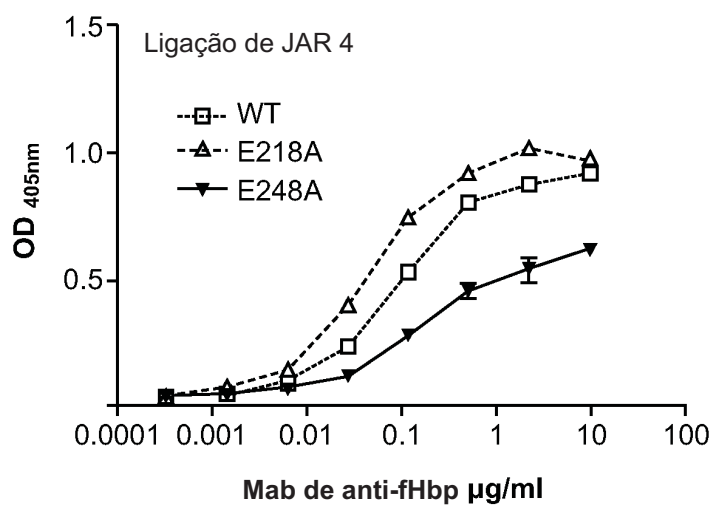
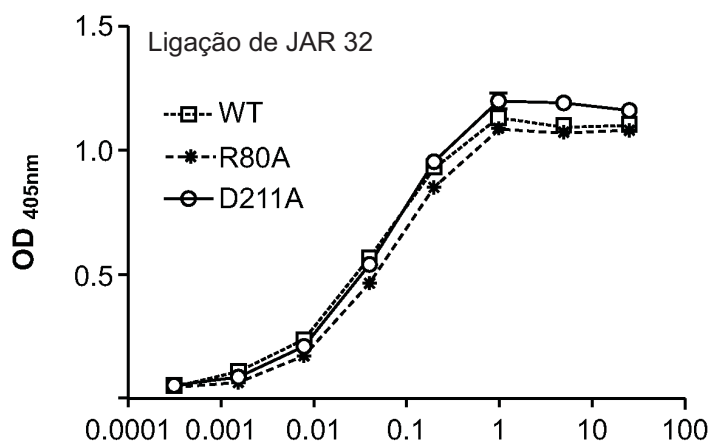


FIG. 25

Ligação de JAR 35 aos mutantes de fHbp ID 22 e do tipo selvagem

Painel A



Painel B

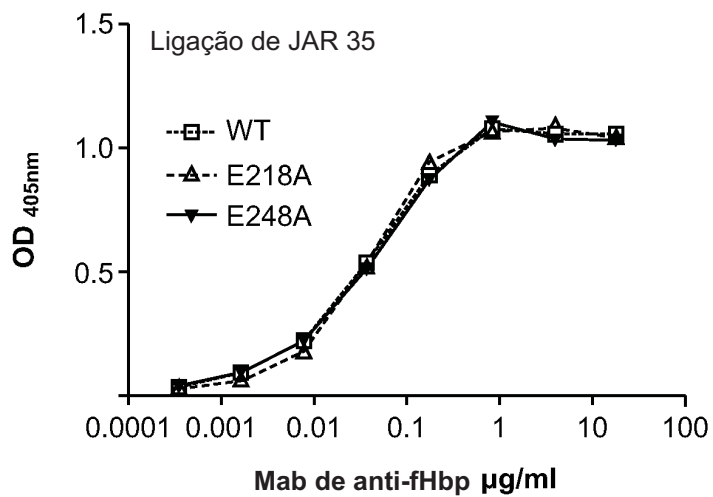


FIG. 26

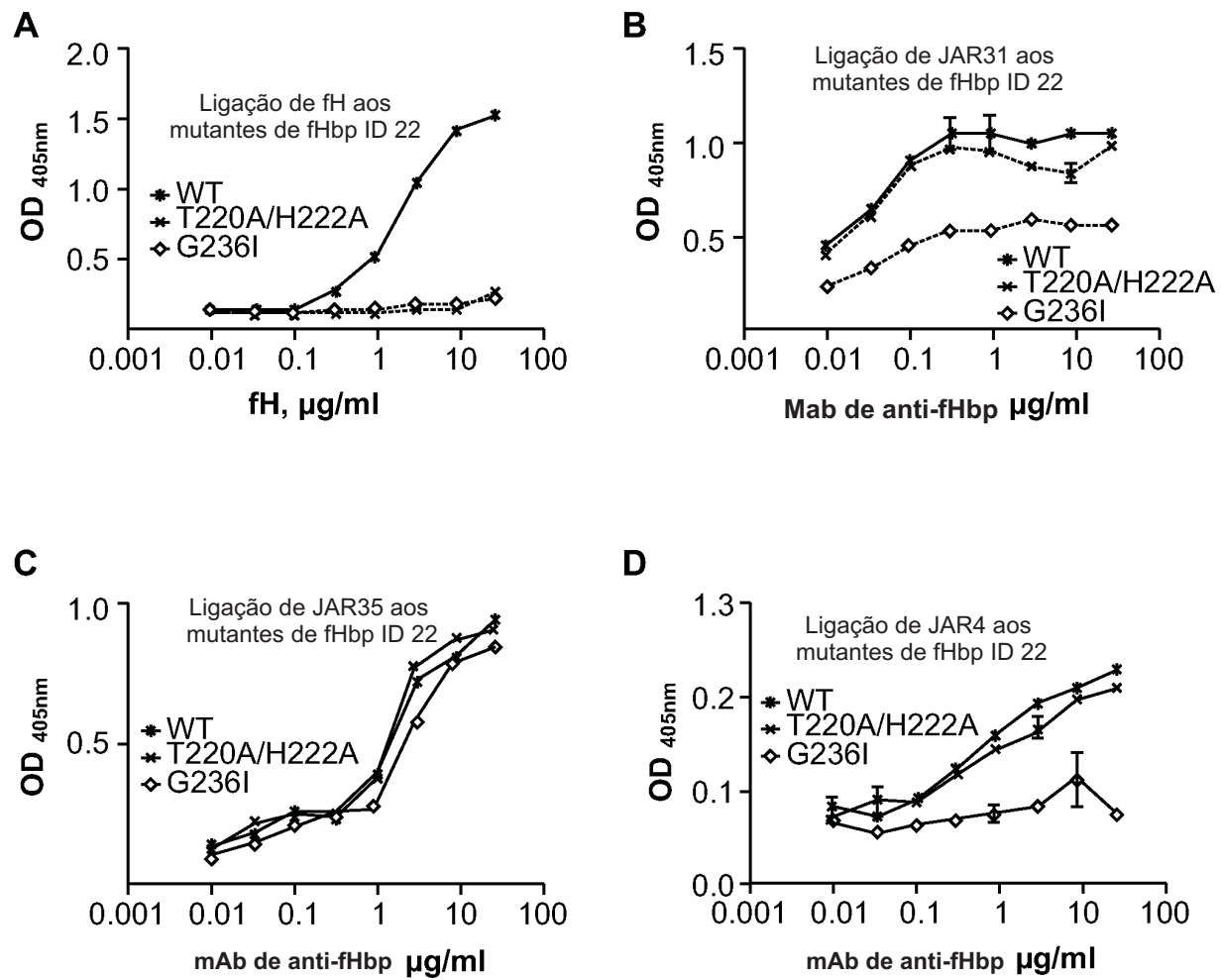


FIG. 27

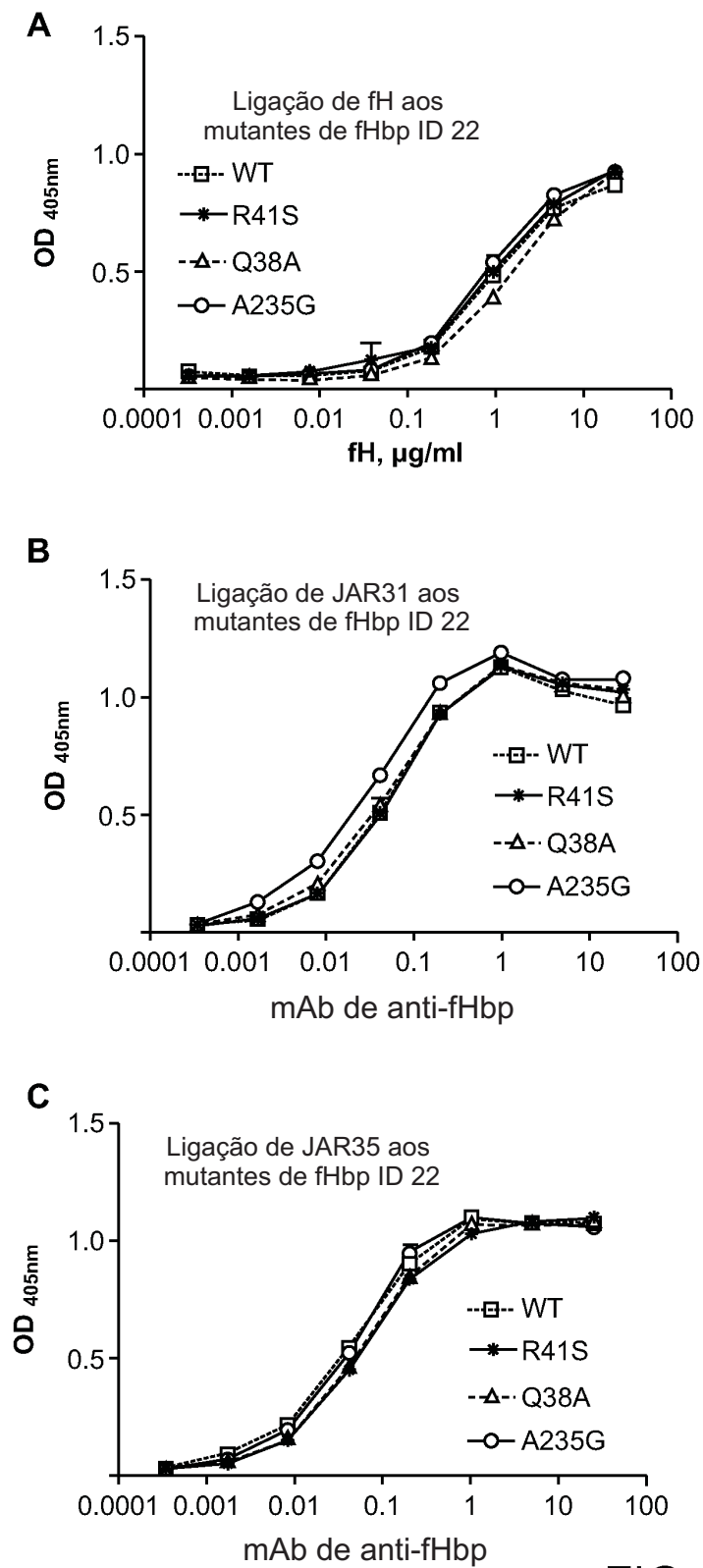


FIG. 28

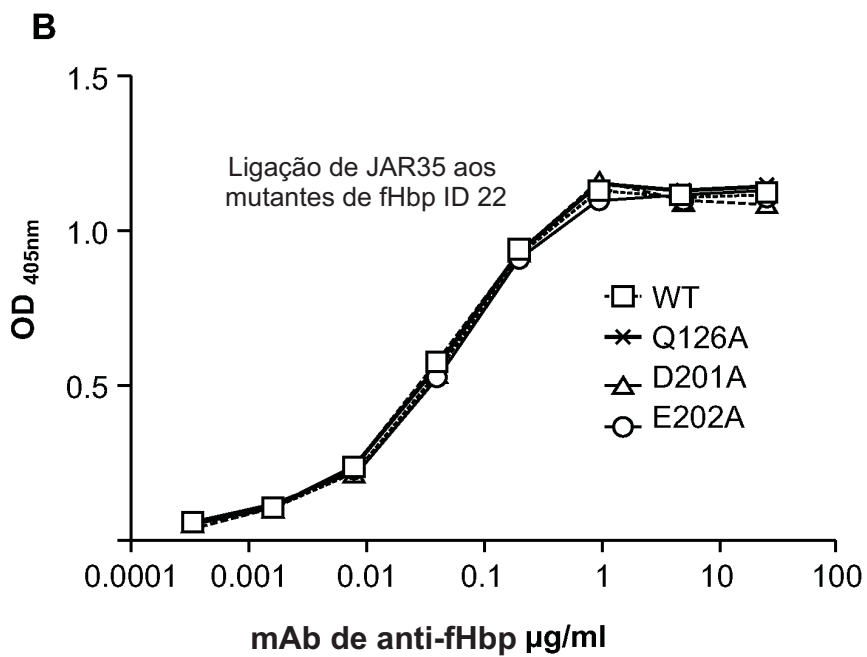
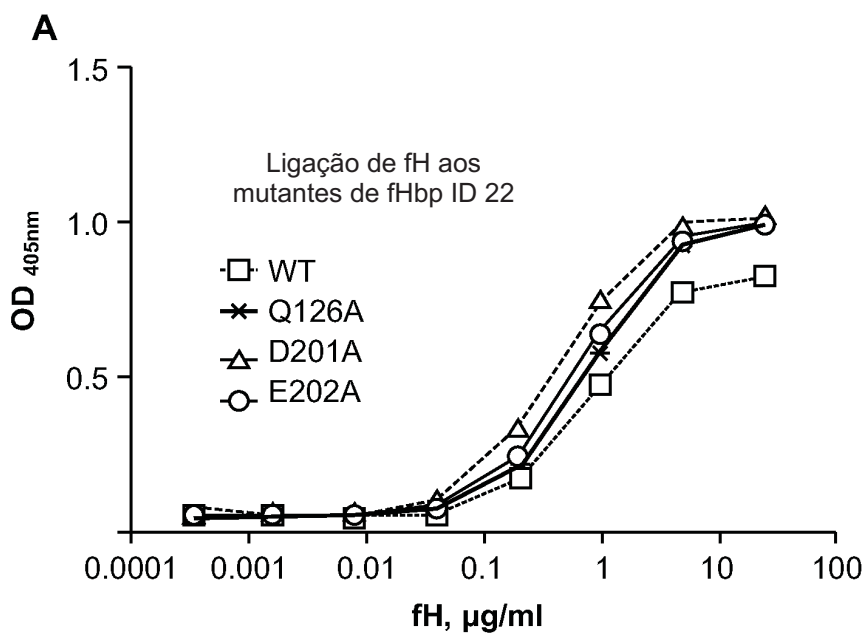


FIG. 29

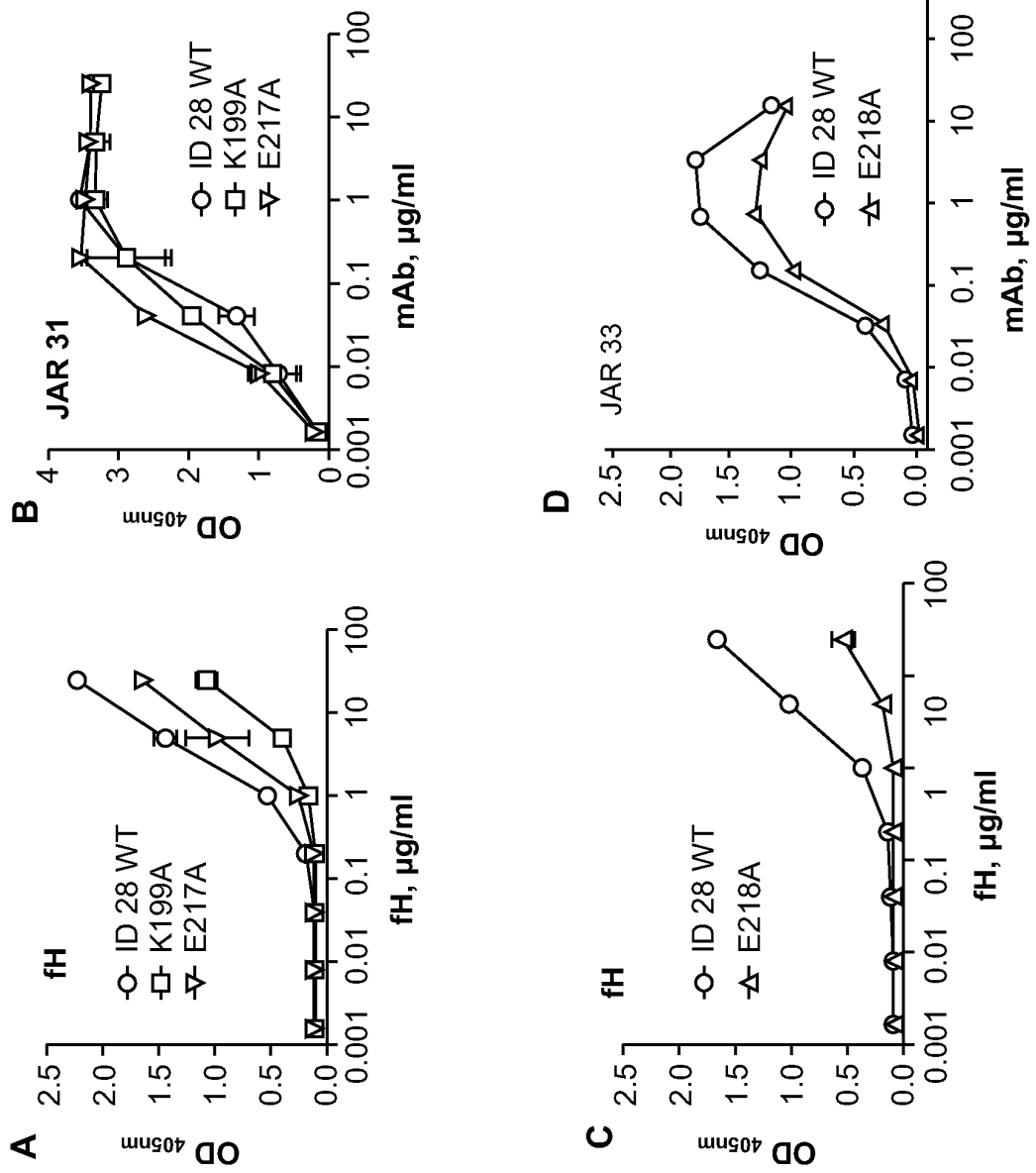


FIG. 30

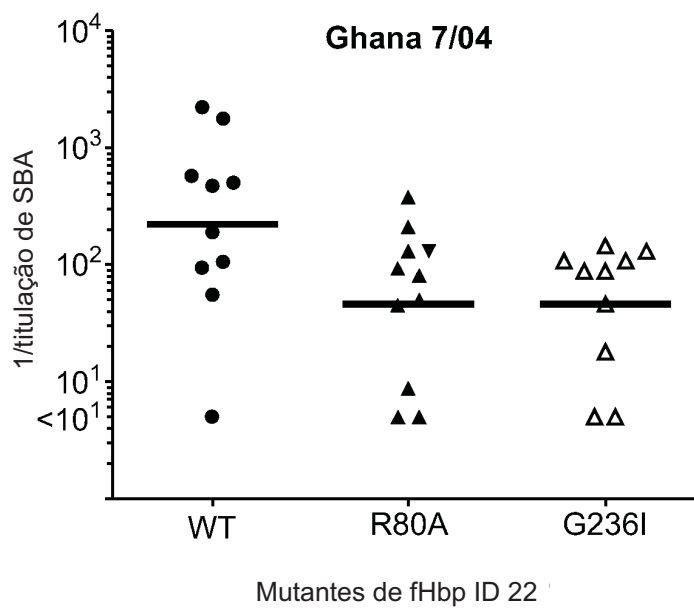
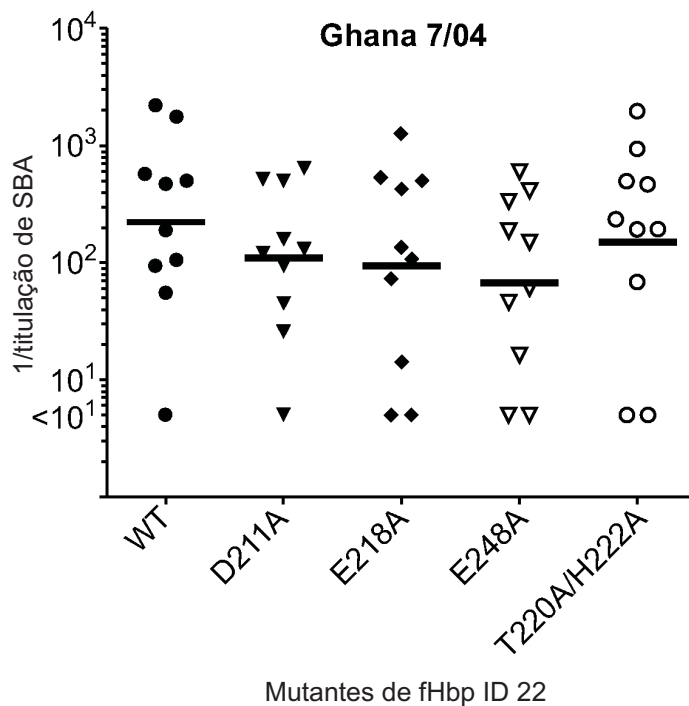


FIG. 32

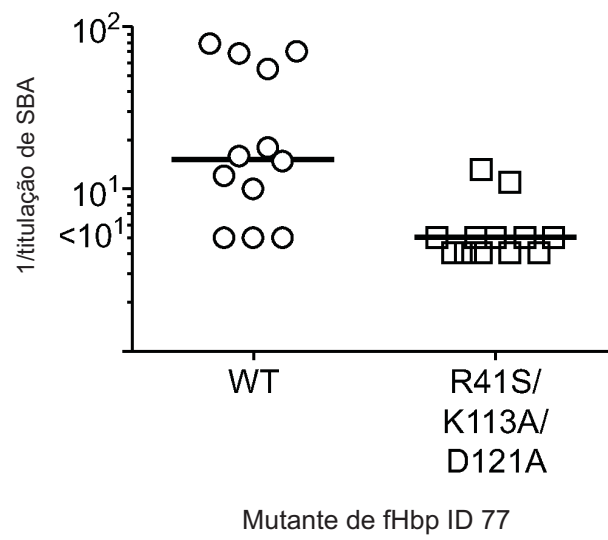


FIG. 33

ID_1 (v.1)	CSSGGGG-----VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEK	55
ID_22 (v.2)	CSS-----GGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEK	55
ID_77 (v.2)	CSS-----GGGGVAADIGARLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEK	55
ID_28 (v.3)	CSSGGGGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTTLTSAQAQAEK	60
Quimera (ID 1/77)	CSS-----GGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEK	55
ID_1	TYGNGD---SLNTGKLNKDKVSRDFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTE	112
ID_22	TYGNGD---SLNTGKLNKDKVSRDFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIE	112
ID_77	TYGNGD---SLNTGKLNKDKVSRDFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIE	112
ID_28	TFKAGDKDNSLNTGKLNKDKISRDFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIE	120
Quimera	TYGNGD---SLNTGKLNKDKVSRDFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTE	112
ID_1	QIQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDF	172
ID_22	KINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLP-SGKAEYHGKAFSSDDPNGLHYSIDF	171
ID_77	KINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLP-DGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDF	171
ID_28	KINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLP-GGKAEYHGKAFSSDDPNGLHYSIDF	179
Quimera	QIQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTAFNQLP-DGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDF	171
ID_1	AAKQGNKGIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQ	232
ID_22	TKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGDRAQ	231
ID_77	AAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQ	231
ID_28	TKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQ	239
Quimera	AAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQ	231
ID_1	EVAGSATEVKTVNGIRHIGLAAKQ	255
ID_22	EIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ	254
ID_77	EIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ	254
ID_28	EIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ	262
Quimera	EIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ	254

37/48

FIG. 34

ID_1	CSSGGGG-----VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVKNEKLKLAQQGAEK	55
ID_22	CSS-----GGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVKNEKLKLAQQGAEK	
ID_77	CSS-----GGGGVAADIGARLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVKNEKLKLAQQGAEK	
ID_28	CSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPONGTLTLSAQQGAEK	
Quimera	CSS-----GGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVKNEKLKLAQQGAEK	
ID_1	TYGNGD---SLNTGKCLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQTE	112
ID_22	TYGNGD---SLNTGKCLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIE	
ID_77	TYGNGD---SLNTGKCLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIE	
ID_28	TFKAGDKDNSLNTGKCLKNDKISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIE	
Quimera	TYGNGD---SLNTGKCLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFTQTE	
ID_1	QIQDSEHSGKMAKQRFRIIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTTIDF	172
ID_22	KINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLP-SGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHYSIDF	
ID_77	KINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLP-DGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTTIDF	
ID_28	KINNPDKTDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLP-GGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHYSIDF	
Quimera	QIQDSEHSGKMAKQRFRIIGDIAGEHTAFNQLP-DGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTTIDF	
ID_1	AAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQ	232
ID_22	TKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKAEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQ	
ID_77	AAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQ	
ID_28	TKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQ	
Quimera	AAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQ	
ID_1	EVAGSAEVTVNGIRHIGLAAKQ	255
ID_22	EIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ	
ID_77	EIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ	
ID_28	EIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ	
Quimera	EIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ	

FIG. 35

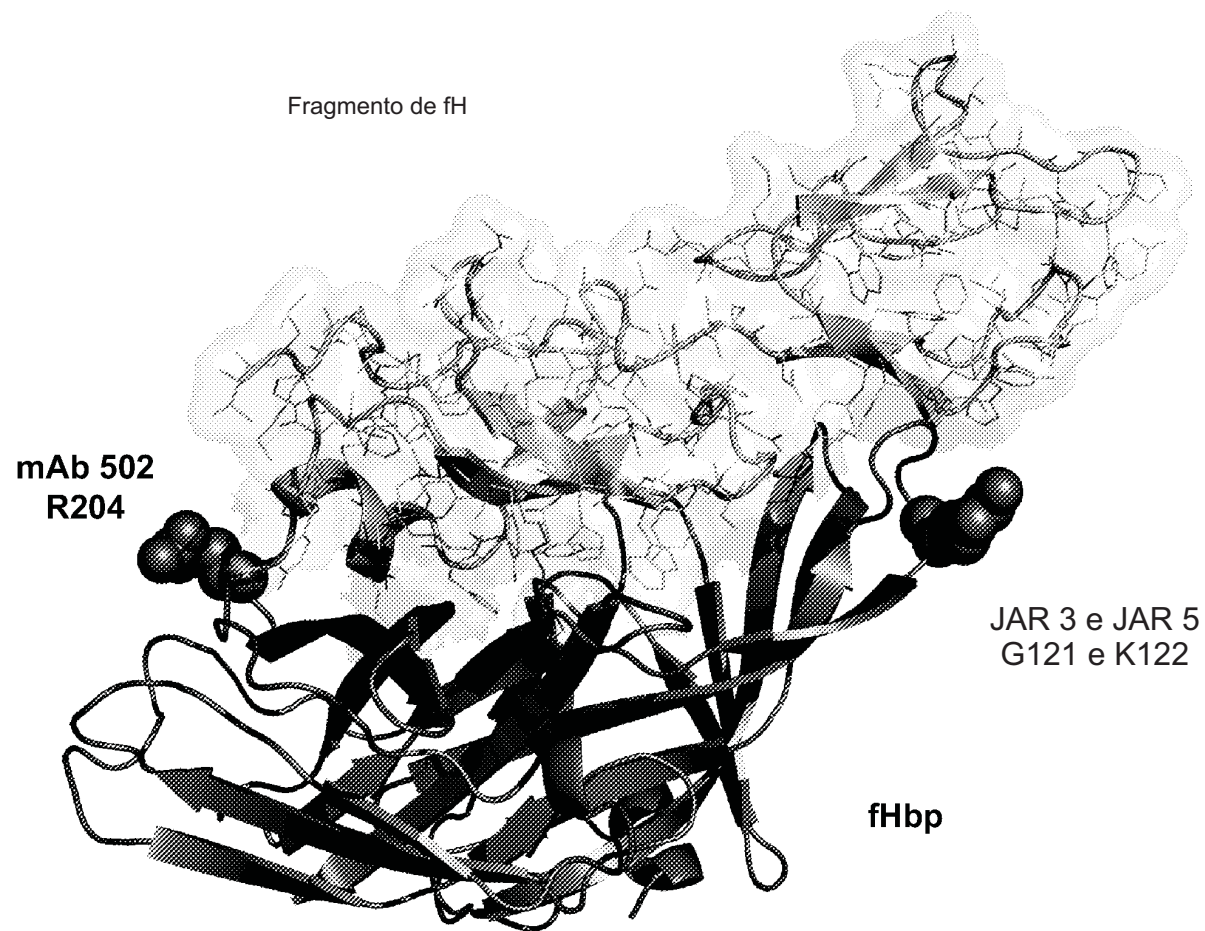
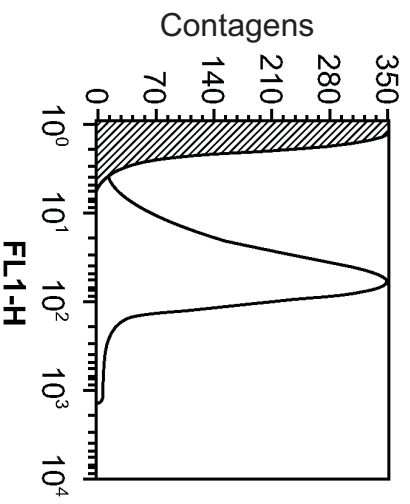
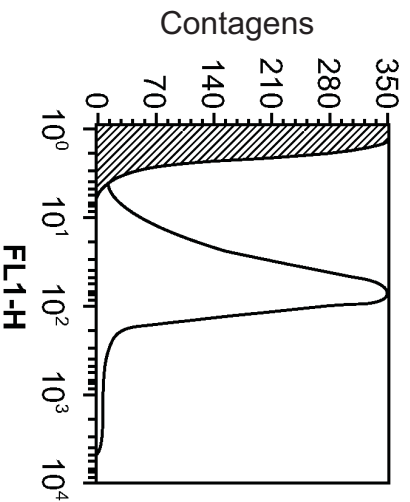
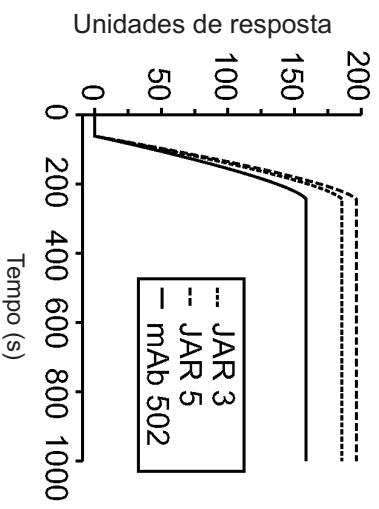
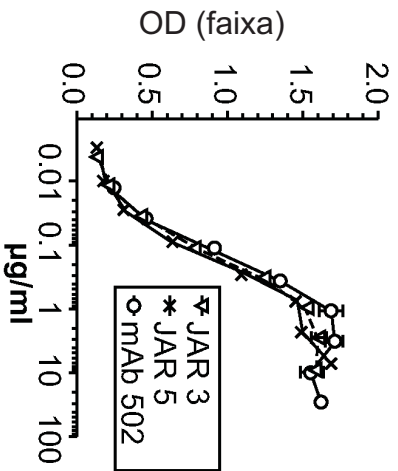


FIG. 36



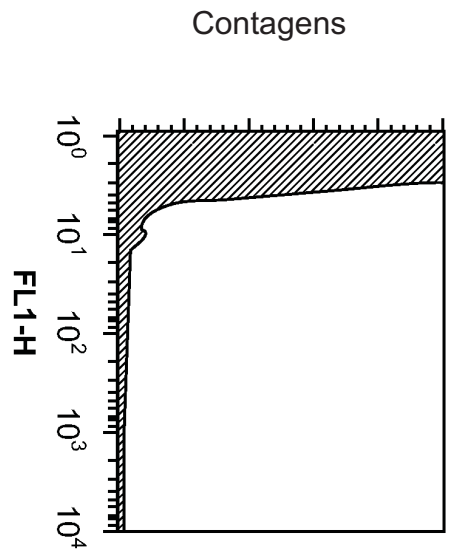


FIG. 38A

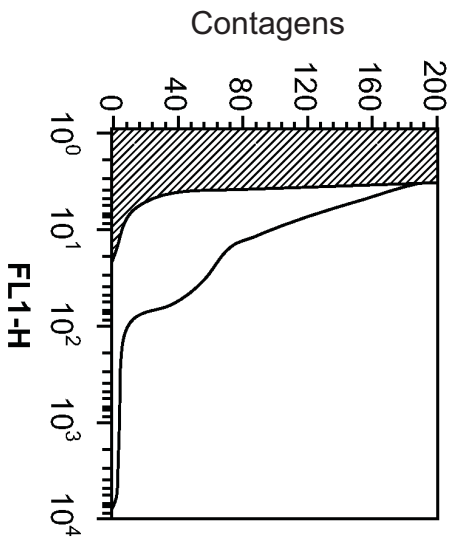


FIG. 38B

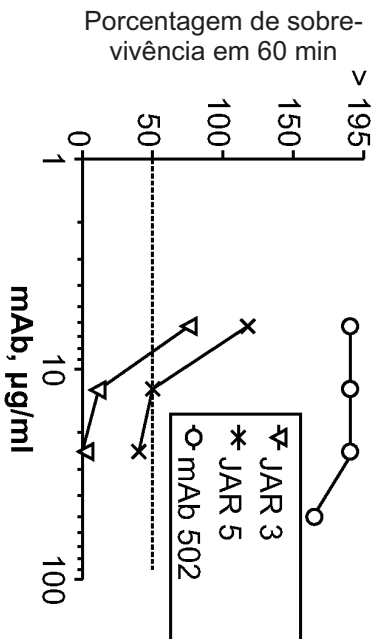


FIG. 38C

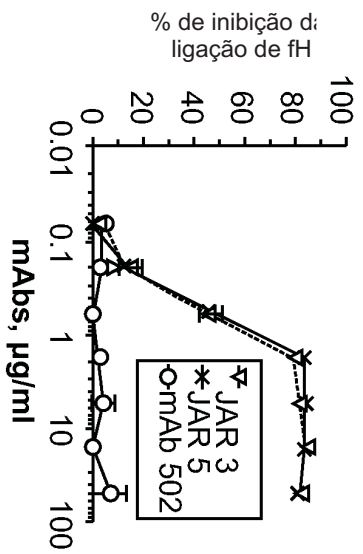


FIG. 39A

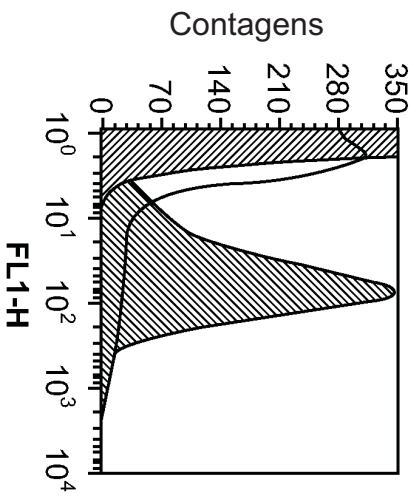


FIG. 39B

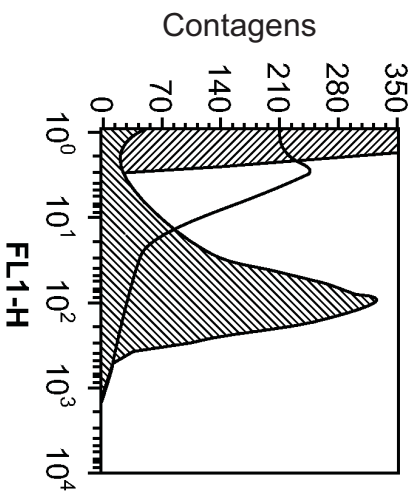


FIG. 39C

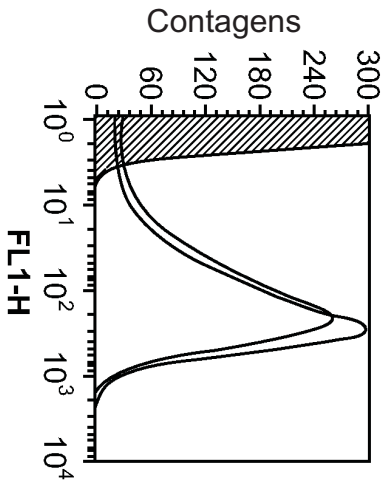


FIG. 40A

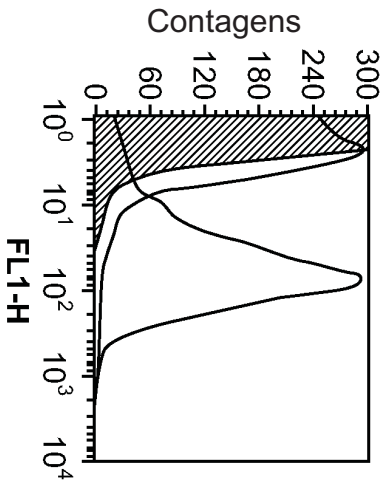


FIG. 40B

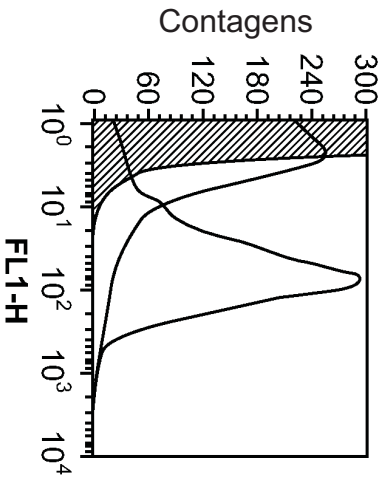


FIG. 40C

Porcentagem de sobrevivência em 60 min (± 2 SE)

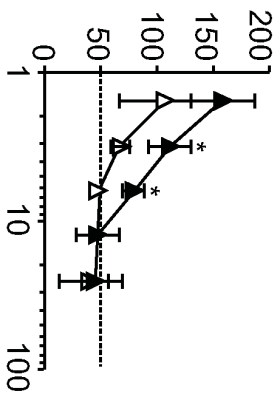


FIG. 41A

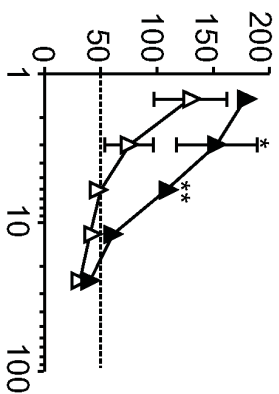


FIG. 41B

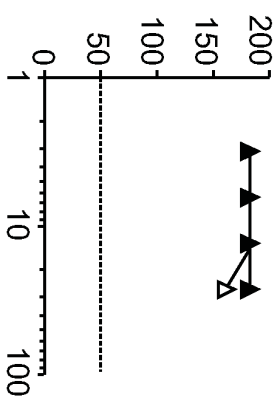


FIG. 41C

Porcentagem de sobrevivência em 60 min (± 2 SE)

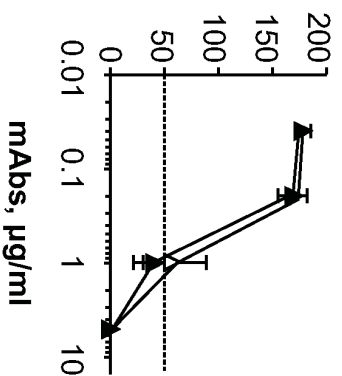


FIG. 41D

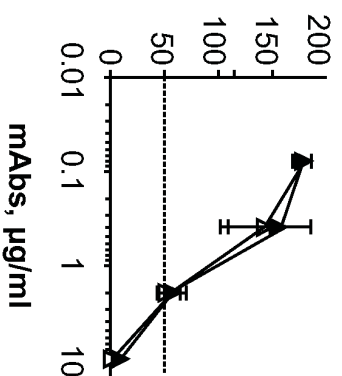


FIG. 41E

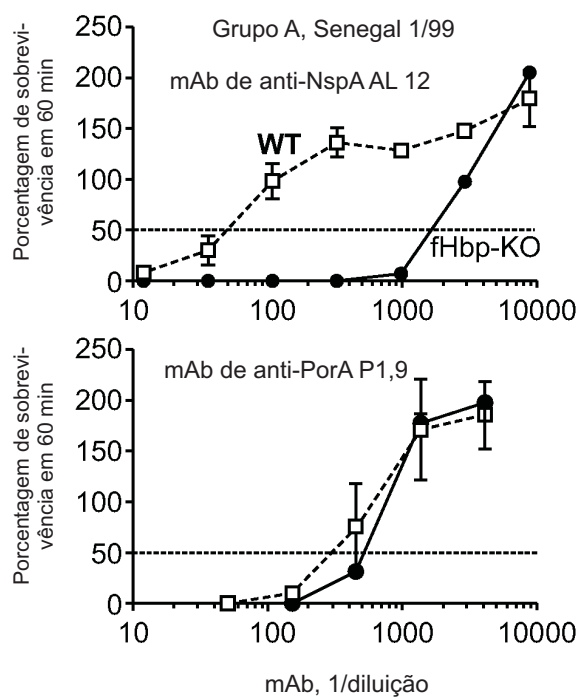


FIG. 42

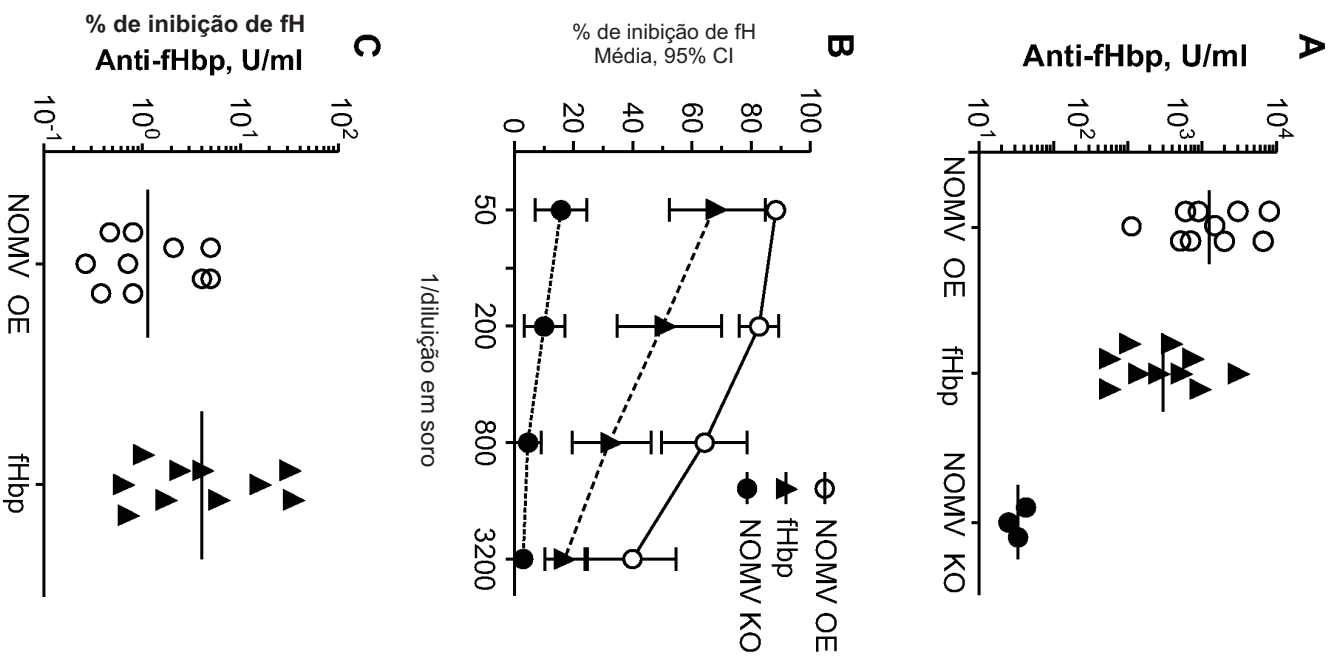


FIG. 43

mkkalatlia lalpaalae gasgfyvqad aahakassl gsakgfspri sagyrindlr
61 favdytrykn ykapstdfkl ysigasaiyd fdtqspvkpy lgarlslnra svdlggsdsf
121 sqtsiglgvl tgvsyavtpn vlldagyryn yigkventvkn vrsgelesvgv rvkf

FIG. 44

Peptídeo ID 1

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLN 70
DKVSRFDfirQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMAKQFRIGDIAGEHTS 140
FDKLPDGGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDFAAQKQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISG 210
SVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ (SEQ ID NO: 1)

Peptídeo ID 22

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLN 70
DKVSRFDfirQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTA 140
FNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNRHLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGD 210
TRYGSEEKGTYYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO: 2)

Peptídeo ID 28

CSSGGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSLAQAQAEKTFKAGDKDNS 70
LNTGKLNKDKISRFDfirQIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVS 140
GLGGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNRHLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAELKADEK 210
SHAVILGDTRYGSEEKGTYYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO: 3)

Peptídeo ID 77

CSSGGGGVAADIGARLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKLN 70
DKVSRFDfirQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTA 140
FNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDFAAQKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGD 210
TRYGSEEKGTYYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO: 4)

Peptídeo ID 15

CSSGGGGSGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTSLAQAQAERTFKAGDKDNS 70
LNTGKLNKDKISRFDfirQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMAKQFRIG 140
DIVGEHTSFGKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAQKQGHGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDE 210
KHHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGIRHIGLAA
KQ (SEQ ID NO: 5)

Quimera I

cssggggvaadigagladaltapldhdkglqsltdqsvrkneklklaaqaqaeptygngdslntgklkn 70
dkvsrfdfirqievdgqlitlesgefvykqshsalfqteqiqdsehsgkmaqfrigdiaGEHTA 140
FNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDFAAQKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGD 210
TRYGSEEKGTYYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ (SEQ ID NO: 8)

48/48

FIG. 45