

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 194**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)

C07K 14/22 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2000 E 10179801 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014 EP 2278007**

54 Título: **Antígenos neisseriales conservados**

30 Prioridad:

30.04.1999 GB 9910168

09.03.2000 GB 0005728

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.07.2014

73 Titular/es:

**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L.
(100.0%)**

**Via Fiorentina 1
53100 Siena (SI), IT**

72 Inventor/es:

RAPPUOLI, RINO

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 477 194 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

Antígenos neisseriales conservados**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a antígenos de bacterias del género *Neisseria* conservados.

10 ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

15 Las bacterias *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae* son diplococos gram negativos, inmóviles, que son patógenos en seres humanos. Basándose en el polisacárido capsular del organismo, se han identificado 12 serogrupos de *N. meningitidis*. El grupo A es el patógeno más frecuentemente implicado en enfermedades epidémicas en el África subsahariana. Los serogrupos B y C son los responsables de la inmensa mayoría de los casos en los Estados Unidos y en países más desarrollados. Los serogrupos W135 e Y son responsables del resto de los casos en los Estados Unidos y en países desarrollados.

20 La vacuna meningocócica actualmente en uso es una vacuna polisacárida tetravalente compuesta por los serogrupos A, C, Y y W135. Sin embargo, esta estrategia no puede usarse para el Meningococo B, porque el polisacárido capsular del menB es un polímero de ácido N-acetil neuramínico unido a $\alpha(2-8)$ que está también presente en el tejido de mamíferos. Una estrategia de una vacuna para el menB utiliza mezclas de proteínas de membrana externa (PME). Para superar la variabilidad antigénica, se han construido vacunas multivalentes que contienen hasta nueve porinas diferentes [por ejemplo, Poolman (1992) Development of a meningococcal vaccine. Infect. Agents Dis. 4: 13-28]. Otras proteínas utilizadas en vacunas de membrana externa han sido las proteínas opa y opc, pero ninguna de estas estrategias han podido superar la variabilidad antigénica [por ejemplo, Ala'Aldeen y Borriello (1996) The meningococcal transferrin-binding proteins 1 and 2 are both surface exposed and generate bactericidal antibodies capable of killing homologous and heterologous strains. Vaccine 14(1): 49-53].

30 En los documentos WO99/24578, WO99/36544, WO99/57280 y WO00/22430 se desvela una gran cantidad de proteínas y secuencias de nucleótidos de *Neisseria*.

Tettelin y col. en [Science (2000) 287: 1809-1815] desvelan datos exhaustivos de secuencias de la cepa MC58.

35 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

40 Para garantizar un reconocimiento y una reactividad máximos de cepas cruzadas, pueden usarse regiones de proteínas que están conservadas entre diferentes especies, serogrupos y cepas de *Neisseria*. Por lo tanto, la invención proporciona proteínas que comprenden tramos de secuencias de aminoácidos compartidos en la mayor parte del género *Neisseria*, particularmente en *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*.

La invención proporciona una proteína que comprende un fragmento de una proteína Neisserial como se define en las reivindicaciones.

45 El fragmento comprende una región antigénica o inmunogénica de la proteína Neisserial.

50 Un aminoácido "conservado" es un aminoácido que, en una proteína de *Neisseria* concreta, está presente al menos en un x % de *Neisseria*. El valor de x puede ser de 50% o mayor, por ejemplo de 66%, 75%, 80%, 90%, 95% o incluso de 100% (es decir, el aminoácido se encuentra en la proteína en cuestión en todo el género *Neisseria*).

55 Para determinar si un aminoácido está "conservado" en una proteína Neisserial concreta, es necesario comparar este resto de aminoácido en las secuencias de la proteína en cuestión a partir de una pluralidad de diferentes especies de *Neisseria* (una "población de referencia"). La población de referencia puede incluir diversas especies de *Neisseria* diferentes (preferentemente *N. meningitidis* y *N.gonorrhoeae*) o puede incluir una sola especie. La población de referencia puede incluir diversos serogrupos diferentes de una especie concreta (tales como los serogrupos A, B, C, W135, X, Y, Z y 29E de *N. meningitidis*) o un solo serogrupo. La población de referencia también puede incluir diversas cepas diferentes de un serogrupo concreto (tales como las cepas NG6/88, BZ198, NG3/88, 297-0, BZ147, BZ169, 528, BZ133, NGE31, NGH38, NGH15, BZ232, BZ83 y 44/76 de *N. meningitidis* B). Una población de referencia preferida consta de las 5 cepas más comunes de *N. meningitidis* y/o de las 5 cepas más comunes de *N. gonorrhoeae*.

60 La población de referencia comprende preferentemente cepas k extraídas de diferentes ramas k de un árbol filogenético adecuado, tales como los descritos en (a) Ni y col. (1992) Epidemiol Infect 109: 227-239 (b) Wolff y col. (1992) Nucleic Acids Res 20: 4657 (c) Bygraves y Maiden (1992) J. Gen. Microbiol. 138: 523-531 (d) Caugant y col.

(1987) J. Bacteriol. 69: 2781-2792. Otro árbol filogenético que puede usarse se muestra en la Figura 1 del presente documento.

5 Se apreciará que, en la población de referencia, sólo se incluirá una especie, serogrupo o cepa concretos, si ésta codifica la proteína en la cual se localiza el aminoácido en cuestión. En el caso de aminoácidos incluidos en la ORF40, descrita más adelante, la población de referencia no debe incluir *N. gonorrhoeae* porque esta especie no contiene la ORF40.

10 Para proteínas solo encontradas en *N. meningitidis*, una población de referencia preferida comprende:

- *N. meningitidis* A, cepa Z2491
- *N. meningitidis* B, cepa NG6/88
- *N. meningitidis* W, cepa A22
- *N.gonorrhoeae*, cepa Ng F62

15 Estas se describen en (a) Seiler y Col1996) Mol. Microbiol. 19(4):841-856 (b) Maiden y col. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3140-3145 (c) Virji y col. (1992) Mol. Microbiol. 6:1271-1279 (d) Dempsey y col. (1991) J. Bacteriol. 173:5476-5486.

20 Para proteínas encontradas sólo en la *N.meningitidis*, sin embargo, una población de referencia preferida comprende:

- *N. meningitidis* A, cepa Z2491
- *N. meningitidis* B, cepa NG6/88
- *N. meningitidis* W, cepa A22

25 Las secuencias de aminoácidos de diferentes *Neisserias* pueden compararse fácilmente usando ordenadores. Típicamente esto implicará el alineamiento de diversas secuencias usando un algoritmo tal como CLUSTAL [Thompson y col. (1994) Nucleic Acids Res 22: 4673-4680; Trends Biochem Sci (1998) 23: 403-405] o, preferentemente, PILEUP [parte del paquete informático GCG de Wisconsin, preferentemente la versión 9.0].

30 Los aminoácidos conservados se aprecian fácilmente en un alineamiento de secuencias múltiple - en la posición del aminoácido en cuestión un gran parte de las secuencias alineadas contendrán el aminoácido en particular. Los aminoácidos conservados pueden apreciarse más visualmente usando un programa tal como BOXSHADE [disponible, por ejemplo, on-line en el NIH], PRETYBOX [GCG] Wisconsin, versión 10] o JALVIEW [disponible on-line en el EBI].

35 La invención también proporciona una proteína que comprende una de las secuencias mostradas en las Figuras.

40 Las proteínas de la invención pueden prepararse, por supuesto, mediante diversos medios (por ejemplo, por expresión recombinante, expresión natural, purificación a partir de cultivo celular, síntesis química, etc.) y en diversas formas (por ejemplo, natural, fusiones, etc.). Preferentemente, se preparan de una forma sustancialmente pura (es decir, sustancialmente libre de otras proteínas *Neisseriales* o células huésped).

45 También se desvelan anticuerpos que se unen a estas proteínas. Éstos pueden ser policlonales o monoclonales y pueden producirse mediante cualquier medio adecuado.

50 De acuerdo con un aspecto adicional, la invención proporciona ácido nucleico que codifica las proteínas de la invención. También debe apreciarse que la invención proporciona ácidos nucleicos que comprenden secuencias complementarias a éstos (por ejemplo para fines antisentido o exploración).

55 También se desvelan en la presente ácidos nucleicos que pueden hibridarse con el ácido nucleico de *N. meningitidis* desvelado en los ejemplos, preferentemente en condiciones de "alta rigurosidad" (por ejemplo 65 °C en una solución de 0,1x SSC, SDS 0,5%).

60 El ácido nucleico de acuerdo con la invención puede prepararse, por supuesto, de diversas maneras (por ejemplo, mediante síntesis química, a partir de bibliotecas genómicas o genotecas de ADNc, a partir del propio organismo, etc.) y pueden adoptar diversas formas (por ejemplo, monocatenario, bicatenario, vectores, sondas, etc.).

Además, la expresión "ácido nucleico" incluye ADN y ARN y también sus análogos, tales como los que contienen estructuras modificadas y también ácidos nucleicos peptídicos (ANP), etc.

65 De acuerdo con un aspecto adicional, la invención proporciona vectores que comprenden secuencias de nucleótidos de la invención (por ejemplo vectores de expresión) y células huésped transformadas con ellas.

De acuerdo con un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones que comprenden proteínas y/o ácidos nucleicos de la invención. Estas composiciones pueden ser adecuadas, por ejemplo, como vacunas, o como reactivos para diagnóstico, o como composiciones inmunogénicas.

5

La invención también proporciona ácidos nucleicos, o proteínas de acuerdo con la invención, para su uso como medicamentos (por ejemplo como vacunas) o como reactivos para diagnóstico. También proporciona el uso de ácido nucleico, o proteínas de acuerdo con la invención en la preparación de: (i) un medicamento para el tratamiento o prevención de infección debida a bacterias Neisseriales; (ii) un reactivo para diagnóstico para detectar la presencia de bacterias Neisseriales o de antibióticos suscitados contra bacterias Neisseriales; y/o (iii) un reactivo que puede suscitar anticuerpos contra bacterias Neisseriales. El uso es preferentemente aplicable a todas las especies de Neisseria.

10

Cuando una proteína Neisserial contiene más de un q % de aminoácidos conservados, la invención proporciona el uso de la proteína Neisserial, o un fragmento de la misma, como una proteína no específica de cepa que presenta reactividad cruzada entre muchas especies, serogrupos y cepas. El valor de q puede ser de 50%, 60%, 75%, 80%, 90%, 95% o incluso de 100%.

15

De acuerdo con otros aspectos, la invención proporciona diversos procedimientos.

20

Se proporciona un procedimiento para producir proteínas de la invención que comprende la etapa de cultivar una célula huésped de acuerdo con la invención en condiciones en las que se induce la expresión de proteína.

25

Se proporciona un procedimiento para producir la proteína o el ácido nucleico de la invención, en el que la proteína o el ácido nucleico se sintetizan en todo o en parte mediante procedimientos químicos.

30

Se proporciona un procedimiento para detectar polinucleótidos de la invención, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una sonda nucleica de acuerdo con la invención con una muestra biológica en condiciones de hibridación para formar dúplex; y (b) detectar dichos dúplex.

35

Se proporciona un procedimiento para detectar proteínas de la invención que comprende las etapas de: (a) poner en contacto un anticuerpo de acuerdo con la invención con una muestra biológica en condiciones adecuadas para la formación de un complejo anticuerpo-antígeno; y (b) detectar dichos complejos.

40

A continuación se proporciona un resumen de las técnicas y procedimientos convencionales que pueden emplearse para realizar la invención (por ejemplo, utilizar las secuencias desveladas para la vacunación o a efectos de diagnóstico). Este resumen no es una limitación de la invención, los ejemplos proporcionados pueden usarse, pero no son necesarios.

General

La realización práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que se encuentran dentro de las habilidades de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, por ejemplo, Sambrook Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Segunda Edición (1989); DNA Cloning, Volúmenes I y II (D.N Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed, 1984); Acid Nucleic Hybridization (B.D. Hames y S.J. Higgins eds. 1984); Transcription and Translation (B.D. Hames y S.J. Higgins eds. 1984); Animal Cell Culture (R.I. Freshney ed. 1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); la serie de Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.), especialmente los volúmenes 154 y 155; Gene Transference Vector for the Mammalian Cells (J.H. Miller y M.P. Calos eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Mayer y Walker, eds. (1987), Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, Londres); Scopes, (1987) Protein Purification: Principles and Practice, Segunda Edición (Springer-Verlag, N.Y.), y Handbook of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (D.M. Weir y C. C. Blackwell eds 1986).

55

En la presente memoria descriptiva se usan las abreviaturas convencionales de los nucleótidos y aminoácidos.

Definiciones

60

Una composición que contienen X está "sustancialmente libre de Y" cuando al menos el 85% en peso del total de X+Y en la composición es X. Preferentemente, X comprende al menos aproximadamente el 90% en peso del total de X+Y en la composición, más preferentemente al menos aproximadamente el 95% o incluso el 99% en peso.

65

La expresión “que comprende” significa “que incluye” así como “que consiste”, por ejemplo, una composición “que comprende” X puede consistir exclusivamente en X, o puede incluir algo adicional a X, tal como X+Y.

5 El término “heterólogo” se refiere a dos componentes biológicos que, por naturaleza, no se encuentran juntos. Los componentes pueden ser células huésped, genes o regiones reguladoras, tales como promotores. Aunque los componentes heterólogos no se encuentren juntos por naturaleza, pueden funcionar conjuntamente, como cuando un promotor heterólogo a un gen está unido operativamente al gen. Otro ejemplo es cuando una secuencia de Neisseria es heteróloga a una célula huésped de ratón. Otro ejemplo sería el de dos epítomos de proteínas iguales o diferentes que se han ensamblado en una sola proteína en una disposición que no aparece en la naturaleza.

15 Un “origen de replicación” es una secuencia de polinucleótidos que inicia y regula la replicación de polinucleótidos, tal como un vector de expresión. El origen de replicación se comporta como una unidad autónoma de replicación de polinucleótidos dentro de una célula, capaz de replicación bajo su propio control. Para que un vector se replique en una célula huésped particular se necesita un origen de replicación. Con algunos orígenes de replicación, puede reproducirse un vector de expresión con un número elevado de copias en presencia de las proteínas adecuadas dentro de la célula. Son ejemplos de orígenes las secuencias de replicación autónoma, que son eficaces en levaduras; y el antígeno viral T, eficaz en células COS-7.

20 Una secuencia “mutante” se define como una secuencia de ADN, ARN o aminoácidos que se diferencia de, pero tiene identidad de secuencia, la secuencia natural o desvelada. Dependiendo de la secuencia particular, el grado de identidad de secuencia entre la secuencia natural o desvelada y la secuencia mutante es preferentemente mayor del 50% (por ejemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% y 99% o más, calculada usando el algoritmo de Smith-Waterman descrito anteriormente). Tal como se usa en el presente documento, una “variante alélica” de una molécula o región de ácido nucleico, para la que dicha secuencia de ácido nucleico se proporciona en el presente documento, es una molécula o región de ácido nucleico que se produce esencialmente en el mismo locus del genoma de otro o segundo aislado, y que, debido a la variación natural causada, por ejemplo, por mutación o recombinación, tiene una secuencia de ácido nucleico similar pero no idéntica. Una región codificante de variante alélica codifica típicamente una proteína que tiene una actividad similar a la de la proteína codificada por el gen con el que se compara. Una variante alélica también puede comprender una modificación en las regiones 5' ó 3' no traducidas del gen, tales como en las regiones reguladoras de control (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos 5.753.235).

35 Sistemas de expresión

Las secuencias de nucleótidos de Neisseria pueden expresarse en una variedad de diferentes sistemas de expresión; por ejemplo, los que se usan en células de mamífero, baculovirus, plantas, bacterias y levadura.

40 i. Sistemas de Mamífero

45 Los sistemas de expresión de mamífero son conocidos en la técnica. Un promotor de mamífero es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse con la ARN polimerasa de mamífero e iniciar la transcripción cadena abajo (3') de una secuencia codificante (por ejemplo, de un gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción, que normalmente se localiza cerca del extremo 5' de la secuencia codificante, y una caja TATA, normalmente ubicada 25-30 pares de bases (pb) cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción. Se piensa que la caja TATA dirige la ARN polimerasa II para que comience la síntesis del ARN el sitio adecuado. Un promotor de mamífero también contendrá un elemento promotor cadena arriba, normalmente localizado de 100 a 200 pb cadena arriba de la caja TATA. Un elemento promotor cadena arriba determina la velocidad a la que se inicia la transcripción y puede actuar en cualquier orientación [Sambrook y col. (1989) “Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells.” In Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^a ed.].

55 Los genes virales de mamífero se expresan a menudo a niveles elevados y tienen un amplio intervalo de huéspedes; por lo tanto las secuencias que codifican genes virales de mamífero proporcionan secuencias promotoras que son del particularmente útiles. Entre los ejemplos se incluye el promotor temprano SV40, el promotor LTR del virus del tumor de mama en ratones, el promotor tardío principal de adenovirus (Ad MLP), y el promotor del virus del herpes simple. Además, las secuencias derivadas de genes no virales, tales como el gen de la metalotionina murina, también proporcionan secuencias promotoras útiles. La expresión puede ser constitutiva o regulada (inducible), dependiendo de si el promotor puede inducirse con glucocorticoides en células sensibles a hormonas.

60 La presencia de un elemento potenciador (potenciador), combinado con los elementos promotores descritos anteriormente, aumentará normalmente los niveles de expresión. Un potenciador es una secuencia de ADN reguladora que puede estimular la transcripción hasta 1000 veces cuando se une a promotores homólogos o heterólogos, comenzando la síntesis en el sitio de inicio normal del ARN. Los potenciadores también son activos

cuando se colocan cadena arriba o cadena abajo del sitio de inicio de la transcripción, en cualquier orientación normal o girada, o a una distancia de más de 1000 nucleótidos desde el promotor [Maniatis y col. (1987) *Science* 236: 1237; Alberts y col. (1989) *Molecular Biology of the Cell*, 2ª ed.]. Los elementos potenciadores derivados de virus pueden ser particularmente útiles, debido a que normalmente tienen un intervalo de huésped más amplio. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador del gen temprano SV40 [Dijkema y col (1985) *EMBO J.* 4: 761] y los promotores/potenciadores derivados de la repetición terminal larga (LTR) del Virus del Sarcoma de Rous [German y col. (1982b) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 6777] y del citomegalovirus humano [Boshart y col. (1985) *Cell* 41: 521]. Adicionalmente, algunos potenciadores pueden regularse, y sólo son activos en presencia de un inductor, tal como una hormona o ión metálico [Sassone-Corsi y Borelli (1986) *Trends Genet.* 2: 215; Maniatis y col. (1987) *Science* 236: 1237].

Una molécula de ADN puede expresarse intracelularmente en células de mamífero. Una secuencia promotora puede unirse directamente con la molécula de ADN, en cuyo caso el primer aminoácido en el extremo N de la proteína recombinante siempre será una metionina, codificada por el codón de inicio ATG. Si se desea, el extremo N puede escindirse de la proteína por incubación in vitro con bromuro de cianógeno.

Como alternativa, a partir de la célula en el medio de cultivo también pueden secretarse proteínas extrañas creando moléculas de ADN quimérico que codifican una proteína de fusión, comprendida por un fragmento de secuencia líder que proporciona la secreción de las proteínas extrañas en las células de mamífero. Preferentemente, existen sitios de procesamiento codificados entre el fragmento líder y el gen extraño que pueden escindirse tanto in vivo como in vitro. El fragmento de secuencia líder normalmente codifica un péptido señal que comprende aminoácidos hidrófobos que dirigen la secreción de la proteína desde la célula. El líder tripartito del adenovirus es un ejemplo de una secuencia líder que proporciona la secreción de las proteínas extrañas en las células de mamífero.

Normalmente, las secuencias de finalización de la transcripción y de poliadenilación que reconocen las células de mamíferos son regiones reguladoras localizadas en 3' con respecto al codón de terminación de la traducción y por tanto, junto con los elementos promotores, flanquean la secuencia codificante. El extremo 3' del ARNm maduro se forma por escisión post-transcripcional específica de sitio y poliadenilación [Birnstiel y col. (1985) *Cell* 41: 349; Proudfoot y Whitelaw (1988) "Termination and 3' end processing of eukaryotic RNA. En *Transcription and splicing* (ed. B.D. Hames y D.M. Glover); Proudfoot (1989) *Trends Biochem. Sci.* 14: 105]. Estas secuencias dirigen la transcripción de un ARNm que puede traducirse en el polipéptido codificado por el ADN. Entre los ejemplos de señales de terminación de la transcripción/poliadenilación se incluyen las derivadas del SV40 [Sambrook y col (1989) "Expression of cloned genes in cultured mammalian cells." In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*].

Normalmente, los componentes descritos anteriormente, que comprenden un promotor, una señal de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción, se ponen juntos en las construcciones de expresión. Si se desea, en una construcción de expresión también pueden incluirse potenciadores, intrones con sitios funcionales aceptores y donantes de corte y empalme y secuencias líder. A menudo, las construcciones de expresión se conservan en un replicón, tal como un elemento extracromosómico (por ejemplo, plásmidos) capaces de conservarse de forma estable en un huésped, tales como células de mamífero o bacterias. Los sistemas de replicación en mamífero incluyen los derivados de virus animales que requieren factores de transactivación para replicarse. Por ejemplo, plásmidos que contienen los sistemas de replicación del papovavirus, tal como el SV40 [Gluzman (1981) *Cell* 23: 175] o del poliomavirus, se replican con un número de copias extremadamente elevado en presencia del antígeno T viral apropiado. Otros ejemplos de replicones de mamífero incluyen los derivados del papilomavirus bovino y del virus Epstein-Barr. Adicionalmente, el replicón puede tener dos sistemas de replicación, lo que permite por tanto mantenerse, por ejemplo, en células de mamífero para la expresión y en un huésped procarionta para la clonación y amplificación. Entre los ejemplos de dichos vectores lanzadera bacteria-mamífero se incluyen pMT2 [Kaufman y col. (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9: 946] y pHEBO [Shimizu y col. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6: 1074].

El procedimiento de transformación usado depende del huésped que vaya a transformarse. Los procedimientos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son conocidos en la técnica e incluyen transfección mediada con dextrano, precipitación con fosfato cálcico, transfección mediada con polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del polinucleótido (o polinucleótidos) en liposomas, y microinyección directa de ADN en los núcleos.

Las líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión son conocidas en la técnica, e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la colección americana de cultivos tipo (ATTC), incluyendo pero sin limitación, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células renales de cría de hámster (BHK), células renales de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), y otras numerosas líneas celulares.

ii. Sistemas de Baculovirus

Los polinucleótidos que codifican las proteínas también pueden insertarse en un vector de expresión de insecto adecuado, y se une operativamente a los elementos de control dentro de dicho vector. La construcción de

vectores emplea técnicas conocidas en la técnica. Generalmente, los componentes del sistema de expresión incluyen un vector de transferencia, normalmente un plásmido bacteriano que contiene tanto un fragmento de genoma de baculovirus como un sitio de restricción conveniente para la inserción de un gen o genes heterólogos a expresar; un baculovirus de tipo silvestre con una secuencia homóloga a la del fragmento específico del baculovirus en el vector de transferencia (esto permite la recombinación homóloga del gen heterólogo en el genoma del baculovirus); y células huésped de insecto adecuadas y un medio de cultivo.

Después de insertar la secuencia de ADN que codifica la proteína en el vector de transferencia, el vector y el genoma viral de tipo silvestre se transfectan en la célula huésped de insecto donde se permite que el vector y el genoma viral se recombinen. El virus recombinante empaquetado se expresa y las placas recombinantes se identifican y purifican. En el comercio se dispone de materiales y procedimientos para los sistemas de expresión de baculovirus/células de insecto en forma de kit de, entre otros, Invitrogen, San Diego CA (kit "Maybach"). Los expertos en la técnica conocen generalmente estas técnicas que se describen por completo en Summers y Smith, Texas Agricultural Experiment Station Boletín N.º. 1555 (1987) (en lo sucesivo, en el presente documento, "Summers y Smith").

Antes de insertar la secuencia de ADN que codifica la proteína en el genoma del baculovirus, los componentes descritos anteriormente, que comprenden un promotor, una secuencia codificante líder (si se desea) de interés, y una secuencia de terminación de la transcripción, normalmente se ensamblan en una construcción intermedia de trans-colocación (vector de transferencia). Esta construcción puede contener un único gen y elementos reguladores unidos operativamente; genes múltiples, cada uno de los cuales con su propio conjunto de elementos reguladores unidos operativamente; o genes múltiples, regulados por el mismo conjunto de elementos reguladores. Las construcciones intermedias de trans-colocación a menudo se mantienen en un replicón, tal como un elemento extracromosómico (por ejemplo, plásmidos), capaces de mantenerse establemente en un huésped, tal como una bacteria. El replicón tendrá un sistema de replicación, lo que le permite mantenerse en un huésped adecuado para la clonación y amplificación.

Actualmente, el vector de transferencia más usado para introducir genes extraños en AcNPV es pAc373. También se han diseñado muchos otros vectores, conocidos por los expertos en la técnica. Entre estos se incluye, por ejemplo, pVL985 (que modifica el codón de inicio de polihedrina desde ATG a ATT, y que introduce un sitio de clonación BamHI 32 pares de bases cadena abajo del ATT; véase Luckow y Summers, *Virology* (1989) 17: 31.

El plásmido normalmente también contiene la señal de poliadenilación de la polihedrina ((Miller y col. (1988) *Ann. Rev. Microbiol.*, 42: 177) y un gen procarionota de resistencia a la ampicilina (amp) y un origen de replicación para la selección y propagación en *E. coli*.

Los vectores de transferencia de baculovirus normalmente contienen un promotor de baculovirus. Un promotor de baculovirus es cualquier secuencia de ADN capaz de unir una ARN polimerasa de baculovirus e iniciar la transcripción cadena abajo (5' a 3') de la secuencia codificante (por ejemplo, un gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción que se localiza normalmente cerca del extremo 5' de la secuencia codificante. Esta región de inicio de la transcripción normalmente incluye un sitio de unión de la ARN polimerasa y un sitio de inicio de la transcripción. Un vector de transferencia de baculovirus también puede tener un segundo dominio denominado potenciador, que, si está presente, normalmente es distal al gen estructural. La expresión puede ser regulada o constitutiva.

Los genes estructurales, que se transcriben abundantemente en los últimos momentos del ciclo de infección viral, proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Entre los ejemplos se incluyen secuencias derivadas del gen que codifica la proteína poliédrica viral Friesen y col., (1986) "The Regulation of Baculovirus Gene Expression," in: *The Molecular Biology of Baculoviruses* (ed. Walter Doerfler); EPO Publ. N.º 127 839 y 155 476; y el gen que codifica la proteína p10, Vlak y col., (1988), *J. Gen. Virol.* 69: 765.

El ADN que codifica las secuencias señal adecuadas puede derivar de genes de proteínas de insecto o baculovirus secretadas, tales como el gen de polihedrina de baculovirus (Carbonell y col. (1988) *Gene*, 73: 409). Como alternativa, dado que parece que las células de insecto reconocen las señales de las modificaciones post- traduccionales de células de mamífero (tal como la señal de escisión peptídica, escisión proteolítica y fosforilación) y que las señales necesarias para la secreción y acumulación nuclear también parecen conservarse entre las células de vertebrado y las células de vertebrado, líderes de origen no insecto, tales como las derivadas de genes que codifican el α -interferón humano Maeda y col., (1985), *Nature* 315: 592; péptido liberador de gastrina humano, Lebacqz-Verheyden y col., (1988), *Molec. Cell. Biol.* 8: 3129; IL-2 humana, Smith y col., (1985) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 82: 8404; IL-3 de ratón, (Miyajima y col., (1987) *Gene* 58: 273; y glucocerebrosidasa humana, Martin y col. (1988) *DNA*, 7: 99, también pueden usarse para proporcionar la secreción en insectos.

Un polipéptido o poliproteína recombinante puede expresarse intracelularmente o, si se expresa con las secuencias reguladoras apropiadas, puede secretarse. La buena expresión intracelular de proteínas extrañas no fusionadas requiere normalmente genes heterólogos que tengan idealmente una secuencia líder corta que contenga

señales adecuadas de inicio de la traducción precedentes a una señal de inicio ATG. Si se desea, la metionina del extremo N puede escindirse de la proteína madura mediante incubación in vitro con bromuro de cianógeno.

5 Como alternativa, las poliproteínas o proteínas recombinantes que no secretan de manera natural pueden secretarse a partir de una célula de insecto creando moléculas de ADN quimérico que codifican una proteína de fusión que comprende un fragmento de secuencia líder que proporciona la secreción de la proteína extraña en insectos. El fragmento de la secuencia líder normalmente codifica un péptido señal que comprende aminoácidos hidrófobos que dirigen la translocación de la proteína en el retículo endoplásmico.

10 Después de la inserción de la secuencia de ADN y/o del gen que codifica el producto de expresión precursor de la proteína, un huésped de célula de insecto se co-transforma con el ADN heterólogo del vector de transferencia y el ADN genómico del baculovirus de tipo silvestre - normalmente por co-transfección. El promotor y la secuencia de terminación de la transcripción de la construcción normalmente comprenderán una sección de 2-5 kb del genoma del baculovirus. Los procedimientos para introducir ADN heterólogo en el sitio deseado del virus de baculovirus son conocidos en la técnica. (Véase Summers y Smith, anteriormente; Ju y col. (1987); Smith y col., Mol. Cell. Biol. (1983) 3: 2156; y Luckow y Summers (1989)). Por ejemplo, la inserción puede realizarse dentro de un gen, tal como el gen de la polihedrina, por recombinación homóloga por cruzamiento doble; la inserción puede realizarse también en un sitio de restricción enzimática diseñado por ingeniería genética en el gen de baculovirus deseado. Miller y col., (1989), Bioessays 4: 91. La secuencia de ADN, cuando se clona en lugar del gen de la polihedrina en el vector de expresión, está flanqueada en 5' y 3' por secuencias específicas de la polihedrina y se coloca cadena abajo del promotor de la polihedrina.

25 El vector de expresión de baculovirus recién formado se empaqueta posteriormente en un baculovirus recombinante infeccioso. La recombinación homóloga se produce con baja frecuencia (entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 5%); por tanto, la mayoría de los virus producidos después de la co-transfección siguen siendo virus de tipo silvestre. Por lo tanto, se necesita un procedimiento para identificar los virus recombinantes. Una ventaja del sistema de expresión es una selección visual que permite diferenciar los virus recombinantes. La proteína polihedrina, que se produce en el virus natural, se produce a niveles muy elevados en los núcleos de las células infectadas en los últimos estadios tras la infección vírica. La proteína polihedrina acumulada forma cuerpos de oclusión que también contienen partículas embebidas. Estos cuerpos de oclusión, de hasta 15 μ m de tamaño, son muy refractarios, lo que les proporciona un aspecto lustroso brillante que es fácil de observar al microscopio óptico. Las células infectadas con virus recombinantes carecen de cuerpos de oclusión. Para diferenciar virus recombinantes de virus de tipo silvestre, el sobrenadante de la transfección se coloca en placas sobre una monoplaca de células de insecto mediante técnicas conocidas por los expertos en la materia. En concreto, las placas se seleccionan al microscopio óptico para detectar la presencia (indicativa de virus de tipo silvestre) o ausencia (indicativa de virus recombinante) de cuerpos de oclusión. "Current Protocols in Microbiology" Vol. 2 (Ausubel y col. eds) en 16.8 (Supl. 10, 1990); Summers y Smith, citados anteriormente; Miller y col. (1989).

40 Se han desarrollado vectores de expresión de baculovirus recombinantes para infección en diversas células de insecto. Por ejemplo, se han desarrollado baculovirus recombinantes para, entre otros, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni* (documento WO 89/046699; Carbonell y col., (1985) J. Viral. 56: 153; Wright (1986) Nature 321: 718; Smith y col., (1983) Mol. Cell. Biol. 3: 2156; y véase generalmente, Fraser, y col. (1989) In Vitro Cell. Dev. Biol. 25:225).

45 Las células y los medios de cultivo celulares se encuentran disponibles en el mercado para la expresión directa y por fusión de polipéptidos heterólogos en un sistema de expresión/baculovirus; la tecnología del cultivo celular es generalmente conocida por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Summers y Smith, citados anteriormente.

50 Después, las células de insecto modificadas pueden cultivarse en un medio nutriente apropiado, que permite el mantenimiento estable del plásmido (o plásmidos) presente en el huésped de insecto modificado. Cuando el producto de expresión génico está bajo el control inducible, el huésped puede crecer hasta una densidad elevada y la expresión se induce. Como alternativa, cuando la expresión es constitutiva, el producto se expresará de manera continua en el medio y el medio nutriente debe estar circulando continuamente, eliminando al mismo tiempo el producto de interés y aumentando los nutrientes consumidos. El producto puede purificarse mediante técnicas cromatográficas, tales como, por ejemplo, HPLC, cromatografía por afinidad, cromatografía de intercambio iónico, etc.; electroforesis; centrifugación en gradiente de densidad; extracción con disolvente o similar. Según sea apropiado, el producto también puede purificarse, si fuese preciso, para eliminar sustancialmente cualquier proteína de insecto que también pudiera secretarse en el medio o resultase de la lisis de las células de insecto, para proporcionar un producto que esté al menos sustancialmente libre de restos del huésped, por ejemplo proteínas, lípidos y polisacáridos.

65 Con el fin de obtener la expresión de la proteína, las células huéspedes recombinantes derivadas de los transformantes se incuban en condiciones que permitan la expresión de la secuencia codificante de la proteína recombinante. Estas condiciones variarán, dependiendo de la célula huésped seleccionada. Sin embargo,

basándose en lo que se conoce en la técnica, los expertos habituales en la técnica puede deducir fácilmente las condiciones.

iii. Sistemas de plantas

Existen muchos cultivos de células de plantas y sistemas de expresión genéticos de plantas conocidos en la técnica. Los sistemas de expresión genéticos de células de plantas ejemplares incluyen los que se describen en las patentes, tales como las patentes de los Estados Unidos 5.693.506; 5.659.122; y 5.608.143. En Zenk, *Phytochemistry* 30: 3861-3863 (1991) se han descrito ejemplos adicionales de expresión genética en cultivos de células de plantas. Pueden encontrarse descripciones de péptidos señal de proteínas de plantas, además de las referencias descritas anteriormente, en Vaultcombe y col., *Mol. Gen. Genet.* 209: 33-40 (1987); Chandler y col., *Plant Molecular Biology* 3: 407-418 (1984); Rogers, J. *Biol. Chem.* 260: 3731-3738 (1985); Rothstein y col., *Gene* 55: 353-356 (1987); Whittier y col., *Nucleic Acids Research* 15: 2515-2535 (1987); Wirsal y col., *Molecular Microbiology* 3: 3-14 (1989); Yu y col., *Gene* 122: 247-253 (1992). Una descripción de la regulación de la expresión de genes de plantas mediante fitohormonas, ácido giberélico y enzimas secretadas inducidas por el ácido giberélico puede encontrarse en R.L. Jones y J. MacMillin, *Gibberellins en: Advanced Plant Physiology*, Malcolm B. Wilkins, ed., 1984 Pitman Publishing Limited, Londres, páginas 21-52. Referencias que describen otros genes regulados por el metabolismo: Sheen, *Plant Cell*, 2: 1027-1038(1990); Maas y col., *EMBO J.* 9: 3447-3452 (1990); Benkel and Hickey, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 1337-1339 (1987).

Típicamente, usando técnicas conocidas en la técnica, se inserta una secuencia de polinucleótidos deseada en un casete de expresión que comprende elementos reguladores genéticos diseñados para funcionamiento en plantas. El casete de expresión se inserta en un vector de expresión deseado que contiene secuencias acompañantes cadena arriba y cadena abajo del casete de expresión adecuado para la expresión en una planta huésped. Las secuencias acompañantes serán de origen plásmido o vírico, y proporcionarán al vector las propiedades necesarias para que los vectores transfieran ADN desde un huésped de clonación original, tal como una bacteria, hasta la planta huésped deseada. La construcción básica de vector bacteriano/planta proporcionará preferentemente una amplia serie de orígenes de replicación de huéspedes procariontes; un marcador de selección procarionte y, para transformaciones con *Agrobacterium*, la secuencia de ADN T para la transferencia mediada con *Agrobacterium* a los cromosomas de plantas. Aunque no es fácil conseguir la detección del gen heterólogo, la construcción también tendrá preferentemente un gen marcador de selección adecuado para determinar si se ha transformado una célula de planta. En Wilmink y Dons, 1993, *Plant Mol. Biol. Repr.*, 11(2): 165-185 se encuentra una revisión general de marcadores adecuados, por ejemplo, para los miembros de la familia de las herbáceas.

También se recomiendan las secuencias adecuadas para permitir la integración de la secuencia heteróloga en el genoma de la planta. Éstas pueden incluir las secuencias transposón y similares para recombinación homóloga, así como secuencias Ti que permiten la inserción aleatoria de un casete de expresión heterólogo en el genoma de la planta. Entre los marcadores de selección procariontes adecuados se incluyen resistencia a antibióticos como la ampicilina o tetraciclina. Como se sabe en la técnica, en el vector también pueden estar presentes otras secuencias de ADN que codifican funciones adicionales.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden incluirse en un casete de expresión para la expresión de la proteína (o proteínas) de interés. Normalmente, habrá un solo casete de expresión, aunque también son factibles dos o más. El casete de expresión recombinante contendrá, además de las secuencias codificantes de la proteína heteróloga, los siguientes elementos: una región promotora, secuencias no traducidas 5' de planta, codón de inicio, dependiendo de si el gen estructural está equipado, o no, con uno, y una secuencia de finalización de la transcripción y traducción. Los sitios de restricción enzimáticos únicos en los extremos 5' y 3' del casete permiten facilitar la inserción en un vector pre-existente.

Una secuencia codificante heteróloga puede ser para cualquier proteína relacionada con la presente invención. La secuencia que codifica la proteína de interés codificará un péptido señal que permita procesar y translocar la proteína, según sea apropiado, y normalmente carecerá de cualquier secuencia que pueda dar como resultado la unión de la proteína deseada de la invención a una membrana. Puesto que, para la mayor parte, la región de inicio de la transcripción será para un gen que se exprese y transloque durante la germinación, empleando el péptido señal que proporciona la translocación también puede proporcionarse la translocación de la proteína de interés. De esta manera, la proteína (o proteínas) de interés se traslocará desde las células en las que se expresan y pueden recogerse eficazmente. Típicamente, la secreción en semillas se realiza a través de la aleurona o capa de epitelio escutelar en el endospermo de la semilla. Aunque no es necesario que la proteína se secrete desde las células en las que se produce la proteína, esto facilita el aislamiento y purificación de la proteína recombinante.

Dado que la expresión final del producto génico deseado será en una célula eucariota, será deseable determinar qué parte del gen clonado contiene las secuencias que se procesarán como intrones por la maquinaria del esplicósoma del huésped. Si es así, puede realizarse mutagénesis dirigida al sitio de la región "intrón" para evitar la pérdida de una parte del mensaje genético en forma de un falso código de intrón, Reed y Maniatis, *Cell* 41: 95-105, 1985.

El vector puede microinyectarse directamente en las células de las plantas mediante micropipetas para transferir mecánicamente el ADN recombinante. Crossway, Mol. Gen. Genet, 202: 179-185, 1985. El material genético también puede transferirse a la célula de la planta usando polietilenglicol, Krens, y col., Nature, 296, 72-74, 1982. Otro procedimiento de introducción de segmentos de ácido nucleico es la penetración balística de alta velocidad mediante partículas pequeñas en el ácido nucleico, ya sea dentro de la matriz de perlas pequeñas o partículas, o en la superficie Klein, y col., Nature, 327, 70-73, 1987 y Knudsen y Muller, 1991, Planta, 185: 330-336 explican el bombardeo de partículas en el endospermo de cebada para crear cebada transgénica. Otro procedimiento más de introducción sería la fusión de protoplastos con otras entidades tanto mini células como células, lisosomas u otros cuerpos de superficie lipídica que pueden fusionarse, Fraley, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1859-1863, 1982.

El vector también puede introducirse en las células de plantas por electroporación. (Fromm y col., Proc. Natl Acad. Sci. USA 82: 5824, 1985). En esta técnica, los protoplastos de plantas se someten a electroporación en presencia de plásmidos que contienen la construcción génica. Impulsos eléctricos de campo alto permeabilizan, de manera reversible, las biomembranas, permitiendo la introducción de los plásmidos. Los protoplastos de plantas sometidos a electroporación reforman la pared celular, la dividen y forman callos de plantas.

Mediante la presente invención pueden transformarse todas las plantas cuyos protoplastos pueden aislarse y cultivarse para dar plantas enteras regeneradas, de manera que las plantas completas que contienen el gen transferido se recuperan. Se sabe que prácticamente todas las plantas pueden regenerarse a partir de células o tejidos cultivados incluyendo, pero sin limitación, todas las especies principales de caña de azúcar, remolacha azucarera, algodón, frutales y otros árboles, legumbres y vegetales. Algunas plantas adecuadas incluyen, por ejemplo, especies de los géneros *Fragaria*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Vigna*, *Citrus*, *Linum*, *Geranium*, *Manihot*, *Daucus*, *Arabidopsis*, *Brassica*, *Raphanus*, *Sinapis*, *Atropa*, *Capsicum*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Lycopersion*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Petunia*, *Digitalis*, *Majorana*, *Cichorium*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Bromus*, *Asparagus*, *Antirrhinum*, *Hererocallis*, *Nemesia*, *Pelargonium*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Ranunculus*, *Senecio*, *Salpiglossis*, *Cucumis*, *Browaalia*, *Glycine*, *Lolium*, *Zea*, *Triticum*, *Sorghum* y *Datura*.

Los medios de regeneración varían de una especie de planta a otra, pero generalmente primero se proporciona una suspensión de protoplastos transformados que contienen copias del gen heterólogo. El tejido del callo se forma y, a partir del callo, los vástagos pueden inducirse y posteriormente enraizarse. Como alternativa, la formación de embriones puede inducirse a partir de la suspensión de protoplastos. Estos embriones germinan como embriones naturales para formar plantas. El medio de cultivo generalmente contendrá diferentes tipos de aminoácidos y hormonas, tales como auxina y citoquininas. Sería también ventajoso añadir medio ácido glutámico y prolina, especialmente para especies como maíz y alfalfa. Los vástagos y las raíces se suelen desarrollar simultáneamente. La generación eficaz dependerá del medio, del genotipo y del historial del cultivo. Si estas tres variables se controlan, entonces la generación es completamente reproducible y puede repetirse.

En algunos sistemas de cultivo de células de plantas, la proteína deseada de la invención puede excretarse o, como alternativa, la proteína puede extraerse de la planta completa. Cuando la proteína deseada de la invención se secreta al medio, puede recogerse. Como alternativa, los embriones y las semillas semi-embriónicas u otro tejido de la planta puede romperse mecánicamente para liberar cualquier proteína secretada entre las células y los tejidos. La mezcla puede suspenderse en una solución tampón para recoger las proteínas solubles. A continuación se usarán procedimientos convencionales de aislamiento y purificación de proteínas para purificar la proteína recombinante. Para optimizar la expresión y recuperación de la proteína heteróloga, se ajustaran los parámetros de tiempo, temperatura, pH, oxígeno y volumen mediante procedimientos rutinarios.

iv. Sistemas bacterianos.

En la técnica se conocen técnicas de expresión bacteriana. Un promotor bacteriano es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse con la ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción cadena abajo (3') de una secuencia codificante (por ejemplo, gen estructural) en un ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción que normalmente se sitúa próxima al extremo 5' de la secuencia codificante. Esta región de inicio de la transcripción normalmente incluye un sitio de unión de la ARN polimerasa y un sitio de inicio de la transcripción. Un promotor bacteriano puede tener también un segundo dominio denominado operador, que puede solapar un sitio de unión de la ARN polimerasa adyacente al cual se inicia la síntesis de ARN. El operador permite la transcripción regulada negativa (inducible), como una proteína de gen represor que puede unir el operador y, por lo tanto, inhibir la transcripción de un gen específico. La expresión constitutiva puede producirse en ausencia de elementos de regulación negativa, tal como el operador. Además, la regulación positiva puede conseguirse mediante una secuencia de proteína de unión de un gen activador que, si está presente, está normalmente próxima (5') a la secuencia de unión de la ARN polimerasa. Un ejemplo de proteína de un gen activador es la proteína activadora de catabolito (PAC), que ayuda a iniciar la transcripción del operón lac en *Escherichia coli* (*E. coli*) [Raibaud y col. (1984) Annu. Rev. Genet. 18: 173]. La expresión regulada puede por tanto ser positiva o negativa, mejorando o reduciendo, de esta forma, la transcripción.

Las secuencias que codifican enzimas de rutas metabólicas proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Entre los ejemplos se incluyen secuencias promotoras derivadas de enzimas que metabolizan azúcares, tales como galactosa, lactosa (lac) [Chang y col. (1977) *Nature* 198: 1056], y maltosa. Otros ejemplos incluyen secuencias promotoras derivadas de enzimas biosintéticas tales como triptófano (trp) [Goeddel y col. (1980) *Nuc. Acids Res.* 8: 4057; Yelverton y col. (1981) *Nucl. Acids Res.* 9: 731; Patente de Estados Unidos 4.738.921; documentos EP-A- 0036776 y EP-A-0121775]. El sistema promotor de la g-laotamasa (bla) [Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes" En *Interferon 3* (ed. I. Gresser)], los sistemas promotores bacteriófago lambda PL [Shimatake y col. (1981) *Nature* 292: 128] y T5 [Patente de Estados Unidos 4.689.406] también proporcionan secuencias promotores útiles.

Además, los promotores sintéticos que no se producen en la naturaleza también actúan como promotores bacterianos. Por ejemplo, las secuencias de activación de la transcripción de un promotor de bacteria o bacteriófago puede unirse con las secuencias de operón de otro promotor de bacteria o bacteriófago, creando un promotor híbrido sintético [Patente de Estados Unidos 4.551.443]. Por ejemplo, el promotor tac es un promotor trp-lac híbrido formado por las secuencias del promotor trp y del operón lac que se regulan mediante el represor lac [Amann y col. (1983) *Gene* 23: 167; de Boer y col. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 21]. Además, un promotor bacteriano puede incluir promotores de aparición natural de origen no bacteriano que tienen la capacidad de unirse con la ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción. Un promotor de origen natural de origen no bacteriano también puede acoplarse con una ARN polimerasa compatible para producir altos niveles de expresión de algunos genes en procariontes. El sistema ARN polimerasa del bacteriófago T7 / promotor es un ejemplo de sistema promotor adecuado [Studier y col. (1986) *J. Mol. Biol.* 189: 113; Tabor y col. (1985) *Proc Natl. Acad. Sci.* 82: 1074]. Además, un promotor híbrido también puede comprender un promotor de bacteriófago y una región operador de *E. coli* (documento EPO-A-0 267 851).

Además de una secuencia promotora funcional, también es útil un sitio de unión eficaz en el ribosoma eficaz para la expresión de genes extraños en procariontes. En *E. coli*, el sitio de unión del ribosoma se denomina secuencia de Shine-Dalgarno (SG), e incluye un codón de inicio (ATG) y una secuencia de 3-9 nucleótidos de longitud localizada 3-11 nucleótidos cadena arriba del codón de inicio [Shine y col. (1975) *Nature* 254: 34]. Se piensa que la secuencia SD promueve la unión del ARNm con el ribosoma mediante el emparejamiento de bases entre la secuencia SD y el extremo 3' del ARNr 16S de *E. coli* [Steitz y col. (1979) "Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA." En *Biological Regulation and Development: Gene Expression* (ed. R.F. Goldberger)]. Para expresar genes eucariotas y genes procariontes con sitios de unión débiles en el ribosoma [Sambrook y col. (1989) "Expression of cloned genes in *Escherichia coli*." En *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*].

Una molécula de ADN puede expresarse intracelularmente. Una secuencia promotora puede unirse directamente con la molécula de ADN, en cuyo caso el primer aminoácido en el extremo N siempre será una metionina, codificada por el codón de inicio ATG. Si se desea, la metionina del extremo N puede escindirse de la proteína por incubación *in vitro* con bromuro de cianógeno o incubando tanto *in vivo* como *in vitro* con una peptidasa metionina N terminal bacteriana (documento EPO-A-0 219 237).

Las proteínas de fusión proporcionan una alternativa a la expresión directa. Normalmente, una secuencia de ADN que codifica la parte N terminal de una proteína bacteriana endógena, u otra proteína estable, se fusiona con el extremo 5' de las secuencias codificantes heterólogas. Después de la expresión, esta construcción proporcionará una fusión de las dos secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, el gen celular del bacteriófago lambda puede unirse al extremo 5' de un gen extraño y expresarlo en la bacteria. La proteína de fusión resultante conserva preferentemente un sitio para el procesamiento de una enzima (factor Xa) para escindir la proteína del bacteriófago procedente del gen extraño [Nagai y col. (1984) *Nature* 309: 810]. Las proteínas de fusión también pueden fabricarse con secuencias procedentes de los genes lacZ [Jia y col. (1987) *Gene* 60: 197], trpE [Allen y col. (1987) *J. Biotechnol.* 5: 93; Makoff y col. (1989) *J. Gen. Microbiol.* 135: 11] y Chey [documento EP-A-0 324 647]. La secuencia de ADN en la unión de las dos secuencias de aminoácidos puede codificar o no un sitio que puede escindirse. Otro ejemplo es la proteína de fusión ubiquitina. Dicha proteína de fusión se fabrica con la región ubiquitina que conserva preferentemente un sitio de procesamiento de enzima (por ejemplo, proteasa de procesamiento específica de la ubiquitina) para escindir la ubiquitina de la proteína extraña. Mediante este procedimiento pueden aislarse proteínas extrañas nativas [Miller y col. (1989) *Biol Technology* 7: 698].

Como alternativa, las proteínas extrañas también pueden secretarse desde la célula creando moléculas de ADN quimérico que codifican una proteína de fusión que comprende un fragmento de secuencia de péptido señal que proporciona la secreción de la proteína extraña en bacterias (Patente de Estados Unidos 4.336.336). El fragmento de secuencia de señal normalmente codifica un péptido de señal comprendido por aminoácidos hidrófobos que dirigen la secreción de la proteína desde la célula. La proteína se secreta en el medio de cultivo (bacterias gram positivas) o en el interior del espacio periplásmico, localizado entre la membrana interna y externa de la célula (bacterias gram negativas). Preferentemente existen sitios de procesamiento que pueden escindirse tanto *in vivo* como *in vitro*, codificados entre el fragmento de péptido señal y el gen extraño.

El ADN que codifica las secuencias señal adecuadas puede derivar de genes de proteínas bacterianas secretadas tales como el gen de la proteína de la membrana externa de *E. coli* (ompA) [Masui y col. (1983), en:

Experimental Manipulation of Gene Expression; Ghayeb y col. (1984) EMBO J. 3: 2437] y la secuencia señal de la fosfatasa alcalina de *E. coli* (*phoA*) [Oka y col. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 7212]. Como ejemplo adicional, la secuencia señal del gen de la alfa-amilasa procedente de diferentes cepas de *Bacillus* puede usarse para secretar proteínas heterólogas a partir de *B. subtilis* [Palva y col. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 79: 5582; documento EP-A-0 244 042].

Normalmente, las secuencias de terminación de la transcripción reconocidas por las bacterias son las regiones reguladoras localizadas en 3' respecto del codón de terminación de la traducción, y así, junto con el promotor, flanquean la secuencia codificante. Estas secuencias dirigen la transcripción de un ARNm que puede traducirse en el polipéptido codificado por el ADN. Las secuencias de terminación de la transcripción frecuentemente incluyen secuencias de ADN de aproximadamente 50 nucleótidos capaces de formar estructuras en tallo de bucle que ayudan a la terminación de la transcripción. Los ejemplos incluyen secuencias de terminación de la transcripción derivadas de genes con promotores fuertes, tales como el gen *trp* de *E. coli* así como otros genes biosintéticos.

Normalmente, los componentes descritos anteriormente, que comprenden un promotor, una secuencia señal (si se desea), una secuencia codificante de interés y una secuencia de terminación de la transcripción, se colocan juntos en construcciones de expresión. Las construcciones de expresión se mantienen a menudo en un replicón tal como un elemento extracromosómico (por ejemplo, plásmidos) capaces de un mantenimiento estable en un huésped, tal como una bacteria. El replicón tendrá un sistema de replicación, que le permite permanecer en un huésped procarionta tanto para la expresión como para la clonación y amplificación. Además, un replicón puede ser un plásmido con número de copias tanto alto como bajo. Un plásmido con un alto número copias generalmente tendrá un número de copias que varía entre aproximadamente 5 a aproximadamente 200 y normalmente entre aproximadamente 10 a aproximadamente 150. Un huésped que contenga un plásmido con un alto número de copias contendrá preferentemente al menos aproximadamente 10, y más preferentemente al menos aproximadamente 20 plásmidos. Puede seleccionarse un vector con un número de copias tanto alto como bajo, dependiendo del efecto del vector y de la proteína extraña en el huésped.

Como alternativa, las construcciones de expresión pueden integrarse en el genoma bacteriano con un vector de integración. Los vectores de integración normalmente contienen al menos una secuencia homóloga al cromosoma bacteriano que permite integrar el vector. Las integraciones parecen ser el resultado de recombinaciones entre ADN homólogo en el vector y el cromosoma bacteriano. Por ejemplo, los vectores de integración contruidos con ADN procedente de diversas cepas de *Bacillus* se integran en el cromosoma de *Bacillus* (documento (EP-A-0 127 328). Los vectores de integración también pueden comprender secuencias de bacteriófago o transposón.

Normalmente, las construcciones de expresión extracromosómicas y de integración pueden contener marcadores de selección que permiten seleccionar cepas bacterianas que se han transformado. Los marcadores de selección pueden expresarse en el huésped bacteriano y pueden incluir genes que hacen que las bacterias sean resistentes a fármacos tales como ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, kanamicina (neomicina), y tetraciclina [Davies y col. (1978) Annu. Rev. Microbiol. 32:469]. Los marcadores de selección pueden también incluir genes biosintéticos, tales como los que se encuentran en las rutas biosintéticas de histidina, triptófano y leucina.

Como alternativa, algunos de los componentes descritos anteriormente se pueden juntar en vectores de transformación. Los vectores de transformación normalmente comprenden un marcador de selección que puede mantenerse bien en un replicón o desarrollarse en un vector de integración, como se ha descrito anteriormente.

Los vectores de expresión y transformación, ya sean replicones extracromosómicos o vectores de integración, se han desarrollado para la transformación en muchas bacterias. Por ejemplo, se han desarrollado vectores de expresión para, entre otras, las siguientes bacterias: *Bacillus subtilis* [Palva y col. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 5582; documentos EP-A-0 036 259 y EPA-0 063 953; documento WO 84/04541], *Escherichia coli* [Shimatake y col. (1981) Nature 292: 128; Amann y col. (1985) Gene 40: 183; Studier y col. (1986) J. Mol. Biol. 189: 113; documentos EP-A-0 036 776, EP-A-0 136 829 y EP-A-0 136 907], *Streptococcus cremoris* [Powell y col. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54: 655]; *Streptococcus lividans* [Powell y col. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655], *Streptomyces lividans* [Patente de Estados Unidos N° 4.745.056].

Los procedimientos para introducir ADN exógeno en huéspedes bacterianos son bien conocidos en la técnica y normalmente incluyen cualquiera de las transformaciones de las bacterias tratadas con CaCl₂, u otros agentes, tales como cationes divalentes y DMSO. El ADN también puede introducirse en las células bacterianas por electroporación. Los procedimientos de transformación normalmente varían con la especie bacteriana a transformar. Véase, por ejemplo, [Masson y col. (1989) FEMS Microbiol. Lett. 60: 273; Palva y col. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 5582; documentos EP-A-0 036 259 y EP-A-0 063 953; documento WO 84/04541, *Bacillus*], [Miller y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 856; Wang y col. (1990) J. Bacteriol. 172: 949, *Campylobacter*], [Cohen y col. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. 69: 2110; Dower y col. (1988) Nucleic Acids Res. 16: 6127; Kushner (1978) "An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids. In Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering (eds. H.W. Boyer y S. Nicosia); Mandel y col. (1970) J. Mol. Biol. 53: 159; Taketo (1988) Biochim. Biophys. Acta 949: 318; *Escherichia*],

[Chassy y col. (1987) FEMS Microbiol. Lett. 44:173 Lactobacillus]; [Fiedler y col. (1988) Anal. Biochem 170: 38, Pseudomonas]; [Augustin y col. (1990) FEMS Microbiol. Lett. 66: 203, Staphylococcus], [Barany y col. (1980) J. Bacteriol. 144: 698; Harlander (1987) "Transformation of Streptococcus lactis by electroporation, en: Streptococcal Genetics (ed. J. Ferretti y R. Curtiss III); Perry y col. (1981) Infect. Immun. 32: 1295; Powell y col. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54: 655; Somkuti y col. (1987) Proc. 4ª Evr. Cong. Biotechnology 1: 412, Streptococcus].

v. Expresión en levaduras

Los sistemas de expresión en levaduras son también conocidos por los expertos habituales en la técnica. Un promotor de levadura es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa de levadura e iniciar la transcripción cadena abajo (3') de una secuencia codificante (por ejemplo, gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción normalmente situada próxima al extremo 5' de la secuencia codificante. Esta región de inicio de la transcripción normalmente incluye un sitio de unión de la ARN polimerasa (la "Caja TATA") y un sitio de inicio de la transcripción. Un promotor de levadura puede tener también un segundo dominio denominado secuencia activadora cadena arriba (UAS, Upstream Activator Sequence), que, si está presente, es normalmente distal al gen estructural. La UAS permite la expresión regulada (inducible). La expresión constitutiva se produce en ausencia de UAS. La expresión regulada puede ser tanto positiva como negativa, mejorando o reduciendo por lo tanto la transcripción.

La levadura es un organismo fermentador con una ruta metabólica activa, por tanto las secuencias que codifican enzimas de la ruta metabólica proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Entre los ejemplos se incluyen alcohol deshidrogenasa (ADH) (documento EP-A-0 284 044), enolasa, glucoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, gliceraldeído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAP o GAPDH), hexoquinasa, fosfofructoquinasa, 3-fosfoglicerato mutasa y piruvato quinasa (PiK) (documento EPO-A-0 329 203). El gen de levadura PH05, que codifica la fosfatasa ácida, también proporciona secuencias promotoras útiles [Myanohara y col. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1].

Además, los promotores sintéticos que no se producen en la naturaleza también actúan como promotores de levadura. Por ejemplo, las secuencias UAS de un promotor de levadura pueden unirse con la región de activación de la transcripción de otro promotor de levadura, creando un promotor híbrido sintético. Los ejemplos de dichos promotores híbridos incluyen la secuencia reguladora ADH unida a la región de activación de la transcripción GAP (Patentes de Estados Unidos Nº 4.876.197 y 4.880.734). Otros ejemplos de promotores híbridos incluyen promotores que contienen las secuencias reguladoras de los genes ADH2, GAL4, GAL10 o PH05, combinados con la región de activación de la transcripción de un gen de enzima glucolítica tal como GAP o PiK (documento EP-A-0 164 556). Además, un promotor de levadura puede incluir promotores de aparición natural de origen no levadura que tienen la capacidad de unirse con la ARN polimerasa de la levadura e iniciar la transcripción. Entre los ejemplos de dichos promotores se incluyen, entre otros, [Cohen y col. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 1078; Henikoff y col. (1981) Nature 283: 835; Hollenberg y col. (1981) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 96: 119; Hollenberg y col. (1979) "The Expression of Bacterial Antibiotic Resistance Genes in the Yeast Saccharomyces cerevisiae," en: Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance (eds. K.N. Timmis y A. Puhler); Mercerau-Puigalon y col. (1980) Gene 11: 163; Panthier y col. (1980) Curr. Genet. 2:109;].

Una molécula de ADN puede expresarse intracelularmente en una levadura. Una secuencia promotora puede unirse directamente con la molécula de ADN, en cuyo caso el primer aminoácido en el extremo N de la proteína recombinante será siempre una metionina, codificada por un codón de inicio ATG. Si se desea, la metionina del extremo N puede escindirse de la proteína incubando in vitro con bromuro de cianógeno.

Las proteínas de fusión proporcionan una alternativa a los sistemas de expresión en levaduras, así como en sistemas de expresión en mamífero, baculovirus y bacterianos. Normalmente, una secuencia de ADN que codifica la parte N-terminal de una proteína endógena de levadura, u otra proteína estable, se fusiona con el extremo 5' de las secuencias codificantes heterólogas. Después de la expresión, esta construcción proporcionará una fusión de las dos secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, el gen de la superóxido dismutasa (SOD) de levadura o de ser humano puede unirse al extremo 5' de un gen extraño y expresarlo en la levadura. La secuencia de ADN en el sitio de unión de las dos secuencias de aminoácidos puede codificar o no un sitio de escisión. Véase, por ejemplo, el documento EP-A-0 196 056. Otro ejemplo es una proteína de fusión ubiquitina. Dicha proteína de fusión se fabrica con la región ubiquitina que conserva preferentemente un sitio de procesamiento de enzima (por ejemplo, proteasa de procesamiento específica de la ubiquitina) para escindir la ubiquitina de la proteína extraña. Por tanto, mediante este procedimiento pueden aislarse proteínas nativas extrañas (por ejemplo, documento WO 88/024066).

Como alternativa, las proteínas extrañas pueden secretarse desde la célula en el medio de cultivo creando moléculas de ADN quimérico que codifican una proteína de fusión que comprende un fragmento de secuencia líder que proporciona la secreción de la proteína extraña en la levadura. Preferentemente, existen sitios de procesamiento, codificados entre el fragmento de secuencia líder y el gen extraño que pueden escindirse tanto in vivo como in vitro. El fragmento de secuencia líder codifica normalmente un péptido señal que comprende aminoácidos hidrófobos que dirigen la secreción de la proteína desde la célula.

El ADN que codifica las secuencias señal adecuadas puede derivar de genes de proteínas de levadura secretadas tales como el gen de invertasa de la levadura (documentos EP-A-0 012 873; JPO. 62.096.086) y el gen del factor A (Patente de Estados Unidos N° 4.588.684). Como alternativa, hay líderes de origen no levadura, tal como un líder de interferón, que también proporcionan la secreción en la levadura (documento EP-A-0 060 057).

Una clase preferida de líderes de secreción es aquella que emplea un fragmento del gen del factor alfa de levadura, que contiene tanto una secuencia "pre-señal" como una región "pro". Los tipos de fragmentos del gen del factor alfa que pueden emplearse incluyen la secuencia líder factor pre-pro alfa de longitud completa (de aproximadamente 83 restos de aminoácidos) así como secuencias líder de factor alfa truncadas (normalmente entre aproximadamente 25 a aproximadamente 50 restos de aminoácidos) (Patentes de Estados Unidos N° 4.546.083 y 4.870.008; documento EP-A-0 324 274). Otras secuencias líder que emplean un fragmento líder del factor alfa que proporcionan secreción incluyen los líderes del factor alfa híbridos que se fabrican con una presecuencia de una primera levadura, pero con una pro-región procedente de un segundo factor alfa de levadura (véase, por ejemplo, el documento WO 89/02463).

Normalmente, las secuencias de terminación de la transcripción reconocidas por las levaduras son las regiones reguladoras localizadas en el extremo 3' con respecto al codón de terminación de la traducción, y por tanto, junto con el promotor, flanquean la secuencia codificante. Estas secuencias dirigen la transcripción de un ARNm que puede traducirse en el polipéptido codificado por el ADN. Son ejemplos de secuencia de terminación de la transcripción y otras secuencias de terminación reconocidas por levaduras, las que codifican enzimas glucolíticas.

Normalmente, los componentes descritos anteriormente, que comprenden un promotor, líder (si se desea), una secuencia codificante de interés y una secuencia de terminación de la transcripción, se colocan juntas en construcciones de expresión. Las construcciones de expresión se mantienen a menudo en un replicón, tal como un elemento extracromosómico (por ejemplo, plásmidos) capaces de mantenerse establemente en un huésped, tal como una levadura o una bacteria. El replicón puede tener dos sistemas de replicación, lo que le permite permanecer, por ejemplo, en una levadura para la expresión y en un huésped de procarionota tanto para la clonación como para la amplificación. Entre los ejemplos de estos vectores lanzadera levadura-bacteria se incluyen YEp24 [Botstein y col. (1979) Gene 8: 17-24], pCl/1 [Brake y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci USA 81: 4642-4646], e YRp17 [Stinchcomb y col. (1982) J. Mol. Biol. 158: 157]. Además, un replicón puede ser un plásmido con número de copias tanto alto como bajo. Un plásmido con número de copias alto generalmente tendrá un número de copias que varía entre aproximadamente 5 a aproximadamente 200, y normalmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 150. Un huésped que contenga un plásmido con número de copias alto contendrá preferentemente al menos aproximadamente 10, y más preferentemente al menos aproximadamente 20 plásmidos. La introducción de un vector con un número de copias alto o bajo puede seleccionarse, dependiendo del efecto del vector y de la proteína extraña en el huésped. Véase, por ejemplo, Brake y col., citado anteriormente.

Como alternativa, las construcciones de expresión pueden integrarse en el genoma de la levadura con un vector integrante. Los vectores integrantes normalmente contienen al menos una secuencia homóloga respecto a un cromosoma de levadura que permite que el vector se integre, y preferentemente contiene dos secuencias homólogas que flanquean la construcción de expresión. Las integraciones parecen ser el resultado de recombinaciones entre ADN homólogos en el vector y en el cromosoma de la levadura [Orr-Weaver y col. (1983) Methods in Enzymol. 101: 228-245]. Un vector integrante puede dirigirse a un locus específico de la levadura seleccionando la secuencia homóloga apropiada para su inclusión en el vector. Véase, Orr-Weaver y col., citado anteriormente. Puede integrarse una o más construcciones de expresión, influyendo posiblemente en los niveles de proteína recombinante producidos [Rine y col. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 6750]. Las secuencias cromosómicas incluidas en el vector pueden presentarse como un único segmento en el vector, que da como resultado la integración del vector completo, o dos segmentos homólogos a segmentos adyacentes en el cromosoma y que flanquean la construcción de expresión en el vector, lo que puede dar como resultado la integración estable de únicamente la construcción de expresión.

Normalmente, las construcciones de expresión extracromosómicas e integrantes pueden contener marcadores de selección que permiten la selección de cepas de levadura que se han transformado. Los marcadores de selección pueden incluir genes biosintéticos que pueden expresarse en el huésped de levadura tales como ADE2, HIS4, LEU2, TRP1 y ALG7, así como genes de resistencia G418, que confieren resistencia a las células de levadura a la tunicamicina y G418, respectivamente. Además, un marcador de selección adecuado también puede proporcionar levaduras con la capacidad de crecer en presencia de compuestos tóxicos, tal como un metal. Por ejemplo, la presencia de CUP1 permite que la levadura crezca en presencia de iones cobre [Butt y col. (1987) Microbiol, Rev. 51: 351].

Como alternativa, algunos de los componentes descritos anteriormente pueden juntarse en vectores de transformación. Los vectores de transformación normalmente comprenden un marcador de selección que se mantiene bien en un replicón o se desarrolla en un vector de integración, como se ha descrito anteriormente.

Los vectores de expresión y transformación, ya sean replicones extracromosómicos o vectores de integración, se han desarrollado para transformación en muchas levaduras. Por ejemplo, se han desarrollado

vectores de expresión para, entre otras, las siguientes levaduras: *Candida albicans* [Kurtz, y col. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6: 142], *Candida maltosa* [Kunze, y col. (1985) *J. Basic Microbiol.* 25: 141], *Hansenula polymorpha* [Gleeson, y col. (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132: 3459; Roggenkamp y col. (1986) *Mol. Gen. Genet.* 202: 302], *Kluyveromyces fragilis* [Das, y col. (1984) *J. Bacteriol.* 158: 1165], *Kluyveromyces lactis* [De Louvencourt y col. (1983) *J. Bacteriol.* 154: 737; Van den Berg y col. (1990) *Bio/Technology* 8: 135], *Pichia guilliermondii* [Kunze y col. (1985) *J. Basic Microbiol.* 25: 141], *Pichia pastoris* [Cregg, y col. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5: 3376; Patentes de Estados Unidos Nº 4.837.148 y 4.929.555], *Saccharomyces cerevisiae* [Hinnen y col. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1929; Ito y col. (1983) *J. Bacteriol.* 153: 163], *Schizosaccharomyces pombe* [Beach y Nurse (1981) *Nature* 300: 706] y *Yarrowia lipolytica* [Davidow, y col. (1985) *Curr. Genet.* 10: 380471 Gaillardin, y col. (1985) *Curr. Genet.* 10: 49].

En la técnica se conocen bien procedimientos para introducir ADN exógeno en huéspedes de levadura, y normalmente incluyen la transformación de esferoplastos o de células de levadura intactas tratadas con cationes alcalinos. Los procedimientos de transformación normalmente varían con la especie de levadura que va a transformarse. Véase, por ejemplo: [Kurtz y col. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6: 142; Kunze y col. (1985) *J. Basic Microbiol.* 25: 141; *Candida*]; [Gleeson y col. (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132: 3459; Roggenkamp y col. (1986) *Mol. Gen. Genet.* 202: 302; *Hansenula*]; [Das y col. (1984) *J. Bacteriol.* 158: 1165; De Louvencourt y col. (1983) *J. Bacteriol.* 154: 1165; Van den Berg y col. (1990) *Bio/Technology* 8: 135; *Kluyveromyces*]; [Cregg y col. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5: 3376; Kunze y col. (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141; Patentes de Estados Unidos Nº 4.837.148 y 4.929.555; *Pichia*]; [Hinnen y col. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929; Ito y col. (1983) *J. Bacteriol.* 153: 163 *Saccharomyces*]; [Beach y Nurse (1981) *Nature* 300: 706; *Schizosaccharomyces*]; [Davidow y col. (1985) *Curr. Genet.* 10: 39; Gaillardin y col. (1985) *Curr. Genet.* 10:49; *Yarrowia*].

Anticuerpos

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido o a un grupo de polipéptidos compuesto al menos por un sitio de combinación de anticuerpo. Un "sitio de combinación de anticuerpo" es un espacio de unión tridimensional con una forma de superficie interna y una distribución de carga complementaria a las características de un epítipo de un antígeno, que permite la unión de un anticuerpo con el antígeno. Un "anticuerpo" incluye, por ejemplo, anticuerpos de vertebrados, anticuerpos híbridos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos modificados, anticuerpos univalentes, proteínas Fab y anticuerpos de dominio único.

Los anticuerpos contra las proteínas de la invención son útiles para cromatografía de afinidad, inmunoensayos y diferenciar/identificar proteínas de *Neisseria*.

Los anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales, contra las proteínas de la invención, pueden prepararse mediante procedimientos convencionales. En general, la proteína se usa primero para inmunizar un animal adecuado, preferentemente un ratón, rata, conejo o cabra. Los conejos y las cabras se prefieren para la preparación de sueros policlonales debido al volumen de suero que puede obtenerse y a la disponibilidad de anticuerpos marcados anti-cabra y anti-conejo. La inmunización se realiza generalmente mezclando o emulsionando la proteína en suero salino, preferentemente en un adyuvante tal como adyuvante completo de Freund, e inyectando la mezcla o emulsión por vía parenteral (generalmente por vía subcutánea o por vía intramuscular). Una dosis de 50-200 µg/inyección suele ser suficiente. La inmunización se estimula generalmente 2-6 semanas después con una o más inyecciones de proteína en suero salino, preferentemente usando adyuvante incompleto de Freund. Como alternativa, pueden generarse anticuerpos por inmunización *in vitro* usando procedimientos conocidos en la técnica, que a efectos de la presente invención, se consideran equivalentes a la inmunización *in vivo*. El antisuero policlonal se obtiene extrayendo sangre del animal inmunizado a un recipiente de vidrio o de plástico, incubando la sangre a 25 °C durante una hora, seguido de incubación a 4 °C durante 2-18 horas. El suero se recupera por centrifugación (por ejemplo, 1.000 g durante 10 minutos). Aproximadamente, en los conejos pueden obtenerse 20-50 ml por extracción de sangre.

Los anticuerpos monoclonales se preparan usando el procedimiento convencional de Kohler y Milstein [Nature (1975) 256: 495-96], o una modificación del mismo. Típicamente, se inmuniza un ratón o una rata como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, en lugar de sangrar al animal para extraer el suero, se extirpa el bazo (y opcionalmente algunos ganglios linfáticos principales) y se disocia en células sencillas. Si se desea, los esplenocitos pueden separarse (tras la retirada de células no específicamente adherentes) aplicando una suspensión celular a una placa o pocillo revestido con el antígeno de la proteína. Las células B que expresan la inmunoglobulina unida con la membrana específicas del antígeno se unen a la placa, y no se eliminan por aclarado con el resto de la suspensión. Las células B resultantes, o todos los esplenocitos disociados, se introducen después para fusionarse con células de mieloma para formar hibridomas y se cultivan en un medio selectivo (por ejemplo, medio de hipoxantina, aminopterina, medio de timidina, "HAT"). Los hibridomas resultantes se colocan en placas con dilución limitada y se someten a ensayo respecto de la producción de anticuerpos que se unen específicamente con el agente inmunizante (y que no se unen con antígenos no relacionados). Los hibridomas que segregan MAb seleccionados se cultivan después *in vitro* (por ejemplo, en frascos de cultivo tisular o en reactores de fibra hueca), o *in vivo* (como ascites en ratones).

Si se desea, los anticuerpos (tanto policlonales como monoclonales) pueden marcarse usando técnicas convencionales. Los marcadores adecuados incluyen fluoróforos, cromóforos, átomos radioactivos (particularmente ³²P y ¹²⁵I), reactivos con densidad electrónica, enzimas, y ligandos que tengan compañeros de unión específicos.

Las enzimas se detectan típicamente por su actividad. Por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante normalmente se usa para detectar su capacidad para convertir la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) en un pigmento azul, cuantificable con un espectrofotómetro. El "compañero de unión específico" se refiere a una proteína capaz de unir una molécula ligando con alta especificidad, como por ejemplo, en el caso de un antígeno y el anticuerpo monoclonal específico del mismo. Otros compañeros de unión específicos incluyen biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A, y las numerosas parejas receptor-ligando conocidas en la técnica. Debe entenderse que la descripción anterior no intenta clasificar los diversos marcadores en distintas clases, ya que el mismo marcador puede actuar de diferentes modos. Por ejemplo, el ¹²⁵I puede usarse como un marcador radioactivo o como un reactivo con densidad electrónica. La HRP puede actuar como una enzima o como un antígeno de un MAb. Adicionalmente, pueden combinarse diversos marcadores para conseguir un efecto deseado. Por ejemplo, los MAb y la avidina pueden requerir marcadores en la realización práctica de la presente invención: por tanto, puede marcarse un MAb con biotina y detectar su presencia con avidina marcada con ¹²⁵I, o con un MAb anti-biotina marcado con HRP. Otras permutaciones y posibilidades serán fácilmente evidentes para los expertos habituales en la técnica, y se consideran como equivalentes en el alcance de la presente invención.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender tanto polipéptidos como ácidos nucleicos de la invención. Las composiciones farmacéuticas comprenderán una cantidad terapéuticamente eficaz tanto de polipéptidos como de polinucleótidos de la invención reivindicada.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de un agente terapéutico para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección deseada, o para mostrar un efecto terapéutico o preventivo detectable. El efecto puede detectarse, por ejemplo, mediante marcadores químicos o niveles de antígeno. Los efectos terapéuticos también incluyen la reducción de los síntomas físicos, tal como la disminución de la temperatura corporal. La cantidad eficaz exacta para un sujeto dependerá de la estatura y salud del sujeto, de la naturaleza y grado de la afección y de los compuestos terapéuticos o combinación de los compuestos terapéuticos seleccionados para la administración. Por tanto, no es útil especificar una cantidad eficaz exacta por adelantado. Sin embargo, la cantidad eficaz para una situación determinada puede determinarse por experimentación rutinaria y queda a juicio del médico tratante.

Para los objetivos de la presente invención, una dosis eficaz estará comprendida entre aproximadamente 0,01 mg/kg a 50 mg/kg o entre 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de las construcciones de ADN en el individuo al cual se administran.

Una composición farmacéutica puede contener también un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo para la administración de un agente terapéutico, tales como anticuerpos o un polipéptido, genes u otros agentes terapéuticos. El término se refiere a cualquier vehículo farmacéutico que, por sí mismo, no induzca la producción de anticuerpos perjudiciales al individuo que recibe la composición, y que pueda administrarse sin toxicidad prevista. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes de metabolización lenta, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, aminoácidos copoliméricos y partículas virales inactivas. Dichos vehículos son muy conocidos por los expertos habituales en la técnica.

En el presente documento pueden usarse sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Un amplio análisis sobre los excipientes farmacéuticamente aceptables se encuentra en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

Los vehículos farmacéuticamente aceptables en las composiciones terapéuticas pueden contener líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, en dichos vehículos, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tampón de pH y similares. Típicamente, las composiciones terapéuticas se preparan en forma de inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. Los liposomas se incluyen en la definición de un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Procedimientos de administración

Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden administrarse directamente al sujeto. Los sujetos a tratar pueden ser animales; en particular, pueden tratarse sujetos humanos.

La administración directa de las composiciones se realizará generalmente mediante inyección, ya sea por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular en el espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también pueden administrarse en una lesión. Otros modos de administración incluyen la administración oral y pulmonar, supositorios y aplicaciones transdérmicas o transcutáneas (véase, por ejemplo, el documento WO 98/20734), agujas y pistolas génicas o hipopulverizadores. La dosificación del tratamiento puede ser un régimen de dosis simple o un régimen de dosis múltiple.

Vacunas

Las vacunas de acuerdo con la descripción pueden ser tanto profilácticas (es decir, para prevenir la infección) como terapéuticas (es decir, para tratar la enfermedad después de la infección).

Dichas vacunas comprenden un antígeno (o antígenos) inmunizante, un inmunógeno (o inmunógenos), un polipéptido (o polipéptidos), una proteína (o proteínas) o ácido nucleico, normalmente en combinación con "vehículos farmacéuticamente aceptables", que incluyen cualquier vehículo que por sí mismo no induzca la producción de anticuerpos nocivos para el individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados son típicamente macromoléculas grandes de metabolización lenta, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, aminoácidos copoliméricos, agregados lipídicos (tales como gotitas de aceite o liposomas) y partículas virales inactivas. Dichos vehículos son muy conocidos por los expertos habituales en la técnica. Adicionalmente, estos vehículos pueden actuar como agentes inmunoestimuladores ("adyuvantes"). Adicionalmente, el antígeno o inmunógeno puede conjugarse con un toxoide bacteriano, tal como un toxoide de los patógenos difteria, tétanos, cólera, *H. pylori*, etc.

Los adyuvantes preferidos para mejorar la eficacia de la composición incluyen, pero sin limitación: (1) sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.; (2) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimuladores específicos tales como muramil péptidos (véase más adelante) o componentes de la pared celular bacteriana, tales como, por ejemplo: (a) MF59™ (documento WO 90/14837; capítulo 10 en *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*, eds. Powell y Newman, Plenum Press 1995), que contiene escualeno al 5%, Owen 80 al 0,5% y Span 85 al 0,5% (conteniendo opcionalmente diferentes cantidades de MTP-PE (véase más adelante), aunque no es necesario) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como un microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, que contiene escualano al 10%, Tween 80 al 0,4%, polímero L121 plurónico bloqueado al 5% y thr-MDP (véase más adelante) tanto microfluidizado en una emulsión submicrométrica como sometido a agitación vorticial para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande y (c) sistema de adyuvante Ribi™(RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene escualeno al 2%, Tween 80 al 0,2% y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforolípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™); (3) pueden usarse adyuvantes de saponina tales como Stimulon™(Cambridge Bioscience, Worcester, MA) o partículas generadas de los mismos tales como ISCOM (complejos inmunoestimuladores); (4) Adyuvante Completo de Freund (CFA) y Adyuvante Incompleto de Freund (IFA); (5) citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferones (por ejemplo gamma interferón), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc; y (6) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimuladores para mejorar la eficacia de la composición. Se prefieren el alumbre y el MF59™.

Como se ha mencionado anteriormente, los muramil péptidos incluyen, pero sin limitación, N-acetil-muramil-L-treonil- D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.

Las composiciones inmunogénicas (por ejemplo, el antígeno inmunizante/inmunógeno/polipéptido/proteína/ácido nucleico, vehículo farmacéuticamente aceptable y adyuvante) contendrán típicamente diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etanol, etc. Además, en dichos vehículos pueden estar presentes sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes de pH y similares.

Típicamente, las composiciones inmunogénicas se preparan en forma de inyectables, bien como soluciones líquidas o suspensiones; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para ponerlas en solución, o en suspensión, en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas para un mejor efecto adyuvante, como se ha mencionado anteriormente en el apartado de vehículos farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de los polipéptidos antigénicos o inmunogénicos, así como cualquier otro de los componentes anteriormente mencionados, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente eficaz", se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, tanto en una sola dosis sencilla o como parte de una serie, es eficaz en el tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y estado físico del individuo que vaya a tratarse, del grupo taxonómico del individuo que vaya a tratarse (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del

sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, del grado de protección deseado, de la formulación de la vacuna, de la evaluación de la situación médica por el doctor tratante y de otros factores relevantes. Se espera que la cantidad se encuentre dentro de un intervalo relativamente amplio, que puede determinarse mediante ensayos rutinarios.

5 Las composiciones inmunogénicas se administran convenientemente por vía parenteral, por ejemplo mediante inyección, por vía subcutánea o intramuscular transdérmica/transcutánea (véase, por ejemplo, el documento WO 98/20734). Otras formulaciones adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones para administración por vía oral y pulmonar, supositorios y aplicaciones transdérmicas. La dosificación del tratamiento puede ser una pauta posológica de una sola dosis o de múltiples dosis. La vacuna puede administrarse junto con otros agentes inmunorreguladores.

10 Como alternativa a las vacunas basadas en proteínas, puede emplearse la vacunación con ADN [por ejemplo, Robinson y Torres (1997) *Seminars in Immunology* 9: 271-283; Donnelly y col. (1997) *Annu Rev Immunol* 15: 617- 648; véase más adelante en el presente documento].

Vehículos de administración de genes

20 Los vehículos de terapia génica para la administración de construcciones que incluyen una secuencia codificante de un agente terapéutico de la invención, para administrar a un mamífero para la expresión en el mismo, pueden administrarse tanto por vía local como sistémica. Estas construcciones pueden utilizar estrategias de vectores virales o no virales en una modalidad in vivo o ex vivo. La expresión de dicha secuencia codificante puede inducirse usando promotores endógenos de mamífero o heterólogos. La expresión de dicha secuencia codificante in vivo puede ser constitutiva o regulada.

25 También se divulgan en la presente vehículos de administración de genes capaces de expresar las secuencias de ácido nucleico contempladas. El vehículo de administración de genes es preferentemente un vector viral y, más preferentemente, un vector retroviral, adenoviral, adeno-asociado viral (AAV), herpes viral o alfavirus. El vector viral también puede ser un vector viral de astrovirus, coronavirus, ortomuixovirus, papovavirus, paramixovirus, parvovirus, picornavirus, poxvirus o togavirus. Véase, en líneas generales, Jolly (1994) *Cancer Gene Therapy* 1: 51-64; Kimura (1994) *Human Gene Therapy* 5: 845-852; Connelly (1995) *Human Gene Therapy* 6: 185-193; y Kaplitt (1994) *Nature Genetics* 6: 148-153.

30 Los vectores retrovirales son bien conocidos en la técnica y se contempla que, en la presente invención, puede usarse cualquier vector retroviral para terapia génica, incluyendo retrovirus de los tipos B, C y D, retrovirus xenotrópicos (por ejemplo, NZB-X1, NZBX2 y NZB9-1 (véase O'Neill (1985) *J. Virol.* 53: 160) retrovirus politrópicos por ejemplo MCF y MCF-MLV (véase Kelly (1983) *J. Virol.* 45: 291), espumavirus y lentivirus. Véase *RNA Tumor Viruses*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985.

35 Las partes del vector para terapia génica retroviral pueden derivar de diferentes retrovirus. Por ejemplo, los retrovectores LTR pueden derivar de un Virus de Sarcoma Murino, de un sitio de unión a ARNt de un Virus de Sarcoma de Rous, de una señal de empaquetamiento de un Virus de Leucemia Murina, y de un origen de síntesis de una segunda cadena de un Virus de la Leucosis Aviar.

40 Estos vectores retrovirales recombinantes pueden usarse para generar partículas de vectores retrovirales competentes en la transducción introduciéndolas en líneas celulares de empaquetamiento adecuadas (véase la Patente de Estados Unidos Nº 5.591.624). Los vectores retrovirales pueden reconstruirse para la integración específica de sitio en el ADN de una célula huésped incorporando una enzima integrasa quimérica en la partícula retroviral (véase el documento WO 96/37626). Es preferible que el vector viral recombinante sea un virus recombinante con defectos en la replicación.

45 Las líneas celulares de empaquetamiento adecuadas para su uso en los vectores retrovirales descritos anteriormente son bien conocidas en la técnica, se preparan fácilmente (véanse los documentos WO 95/30763 y WO 92/05266), y pueden usarse para producir líneas celulares (denominadas también líneas celulares vectoriales o "LCV") para la producción de partículas vectoriales recombinantes. Preferentemente, las líneas celulares de empaquetamiento se fabrican a partir de células parentales humanas (por ejemplo, células HT1080) o de líneas celulares parentales de visón, lo que elimina la inactivación en suero humano.

50 Los retrovirus preferidos para la construcción de vectores retrovirales para terapia génica incluyen el Virus de Leucosis Aviar, el Virus de la Leucemia Bovina, el Virus de la Leucemia Murina, el Virus Inductor de Focos Celulares en el Visón, el Virus del Sarcoma Murino, el Virus de la Reticuloendoteliosis y el Virus del Sarcoma de Rous. Se prefieren particularmente los Virus de la Leucemia Murina que incluyen 4070A y 1504A (Hartley y Rowe (1976) *J Virol* 19: 19-25), Abelson (ATCC Nº VR-999), Friend (ATCC Nº VR-245), Graffi, Gross (ATCC Nol VR-590), Kirsten, Virus del Sarcoma de Harvey y Rauscher (ATCC Nº VR-998) y Virus de la Leucemia Murina de Moloney (ATCC Nº VR-190). Dichos retrovirus pueden obtenerse de depósitos o colecciones tales como la Colección

Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") en Rockville, Maryland, o aislarse de fuentes conocidas usando técnicas normalmente disponibles.

5 Los vectores retrovirales conocidos ejemplares para terapia génica que pueden emplearse en la presente invención incluyen los descritos en las Solicitudes de Patente GB2200651, EP0415731, EP0345242, EP0334301, WO89/02468; WO89/05349, WO89/09271, WO90/02806, WO90/07936, WO94/03622, WO93/25698, WO93/25234, WO93/11230, WO93/10218, WO91/02805, WO91/02825, WO95/07994, US 5.219.740, US 4.405.712, US 4.861.719, US 4.980.289, US 4.777.127, US 5.591.624. Véase también Vile (1993) Cancer Res 53: 3860-3864; Vile (1993) Cancer Res 53: 962-967; Ram (1993) Cancer Res 53 (1993) 83-88; Takamiya (1992) J Neurosci Res 33: 493-503; Baba (1993) J Neurosurg 79: 729-735; Mann (1983) Cell 33: 153; Cane (1984) Proc Natl Acad Sci 81: 6349; y Miller (1990) Human Gene Therapy 1.

15 Los vectores adenovirales para terapia génica humana también se conocen en la técnica y pueden emplearse en la presente invención. Véase, por ejemplo, Berkner (1988) Biotechniques 6: 616 y Rosenfeld (1991) Science 252: 431, y los documentos WO93/07283, WO93/06223 y WO93/07282. Los vectores adenovirales para terapia génica ejemplares conocidos que pueden emplearse en la presente invención incluyen los descritos en los documentos indicados anteriormente y en los documentos WO94/12649, WO93/03769, WO93/191, WO94/28938, WO95/11984, WO95/00655, WO95/27071, WO95/29993, WO95/34671, WO96/05320, WO94/08026, WO94/11506, WO93/06223, WO94/24299, WO95/14102, WO95/24297, WO95/02697, WO94/28152, WO94/24299, WO95/09241, WO95/25807, WO95/05835, WO94/18922 y WO95/09654. Como alternativa, puede emplearse la administración de ADN ligado a adenovirus destruidos, tal como describe Curiel (1992) en Hum. Gene Ther. 3: 147-154. Los vehículos para la administración de los genes de la invención también incluyen vectores de virus adenoasociados (AAV). Los ejemplos principales y preferidos de este tipo de vectores para su uso en la presente invención son los vectores basados en AAV-2 desvelados en Srivastava, documento WO93/09239. Los vectores AAV más preferidos comprenden las dos repeticiones terminales invertidas AAV en las que las secuencias D nativas se modifican mediante la sustitución de nucleótidos, tales como al menos 5 nucleótidos nativos y hasta 18 nucleótidos nativos, preferentemente al menos 10 nucleótidos nativos hasta 18 nucleótidos nativos, más preferentemente se conservan 10 nucleótidos nativos y el resto de nucleótidos de la secuencia D se delecionan o se sustituyen con nucleótidos no nativos. Las secuencias D nativas de las repeticiones terminales AAV invertidas son secuencias de 20 nucleótidos consecutivos en cada repetición terminal AAV invertida (es decir, hay una secuencia en cada extremo) que no está implicada en la formación de HP. El nucleótido no nativo de sustitución puede ser cualquier nucleótido distinto del nucleótido que se encuentra en la secuencia D nativa en la misma posición. También pueden emplearse otros vectores AAV ejemplares como pWP-19, pWN-1, ambos desvelados en Nahreini (1993) Gene 124: 257-262. Otro ejemplo de este tipo de vector AAV es psub201 (véase Samulski (1987) J. Virol. 61: 3096). Otro vector AAV ejemplar es el vector ITR Doble D. La construcción del vector ITR Doble D se desvela en la Patente de Estados Unidos 5.478.745. Otros vectores adicionales son los que desvela Carter en la Patente de Estados Unidos nº 4.797.368 y Muzyczka en la Patente de Estados Unidos de nº 5.139.941, Chartejee en la Patente de Estados Unidos nº 5.474.935 y Kotin en el documento WO94/288157. Otro ejemplo adicional de un vector AAV que puede emplearse en la presente invención es el SSV9AFABTKneo, que contiene el mejorador AFP y un promotor de albúmina y dirige la expresión predominantemente en el hígado. Su estructura y construcción se desvela en Su (1996) Human Gene Therapy 7: 463-470. Otros vectores AAV para terapia génica se describen en los documentos US 5.354.678, US 5.173.414, US 5.139.941 y US 5.252.479.

45 Los vectores para terapia génica de la invención también incluyen los vectores del herpes. Los ejemplos principales y preferidos son los vectores del virus del herpes simple que contienen una secuencia que codifica un polipéptido de la timidina quinasa como el que se describe en los documentos US 5.288.641 y EP0176170 (Roizman). Ejemplos adicionales de vectores del virus del herpes simple incluyen HFEM/ICP6-LacZ desvelado en el documento WO95/04139 (Wistar Institute), pHSVlac descrito en Geller (1988) Science 241: 1667-1669 y en los documentos WO90/09441 y WO92/07945, HSV Us3::pgC-lacZ descrito en Fink (1992) Human Gene Therapy 3: 11-19 y HSV 7134, 2 RH 105 y GAL4 descritos en el documento EP 0453242 (Breakefield), y los depositados en la ATCC con los números de acceso ATCC VR-977 y ATCC VR-260.

55 También se contemplan los vectores del virus alfa para terapia génica que pueden también emplearse en la presente invención. Los vectores del virus alfa preferidos son los vectores del virus Sindbis, Togavirus, virus del Bosque Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), virus Middleberg (ATCC VR-370), virus del Río Ross (ATCC VR-373; ATCC VR-1246), virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR923; ATCC VR-1250; ATCC VR-1249; ATCC VR-532) y los descritos en las Patentes de Estados Unidos 5.091.309, 5.217.879 y WO92/10578. Más particularmente, pueden emplearse los vectores del virus alfa descritos en la patente con Nº de Serie de Estados Unidos 08/405.627, presentada el 15 de marzo de 1995, y los documentos WO94/21792, WO92/10578, WO95/07994, US 5.091.309 y US 5.217.879. Dichos virus alfa pueden obtenerse a partir de depósitos o colecciones tales como la ATCC en Rockville, Maryland o aislarse a partir de fuentes conocidas usando técnicas comúnmente disponibles. Preferentemente, se usan los vectores del virus alfa con citotoxicidad reducida (véase el documento USSN 08/679640).

65 Los sistemas de vector de ADN tales como los sistemas de expresión basados en eucariotas también son útiles para expresar los ácidos nucleicos de la invención. Véase el documento WO95/07994 para una descripción

detallada de los sistemas de expresión basados en eucariotas. Preferentemente, los sistemas de expresión basados en eucariotas de la invención derivan de vectores del virus alfa y más preferentemente de vectores virales Sindbis.

5 Otros vectores virales adecuados para su uso en la presente invención incluyen los derivados del poliovirus, por ejemplo ATCC VR-58 y los descritos en Evans, Nature 339 (1989) 385 y Sabin (1973) J. Biol. Standardization 1: 115; rinovirus, por ejemplo ATCC VR-1110 y los descritos en Arnold (1990) J Cell Biochem L401; virus de la viruela tales como el virus de la viruela del canario o el virus de la vacuna, por ejemplo ATCC VR-111 y ATCC VR-2010 y los descritos en Fisher-Hoch (1989) Proc Natl Acad Sci 86: 317; Flexner (1989) Ann NY Acad Sci 569: 86, Flexner (1990) Vaccine 8: 17; en los documentos US 4.603.112 y US 4.769.330 y WO89/01973; virus SV40, por ejemplo 10 ATCC VR-305 y los descritos en Mulligan (1979) Nature 277: 108 y Madzak (1992) J Gen Virol 73: 1533; virus de la gripe, por ejemplo ATCC VR-797 y virus de la gripe recombinante fabricados por técnicas de ingeniería genética inversa como se describe en el documento US 5.166.057 y en Enami (1990) Proc Natl Acad Sci 87: 3802-3805; Enami y Palese (1991) J Virol 65: 2711-2713 y Luytjes (1989) Cell 59: 110, (véase también McMichael (1983) NEJ 15 Med 309: 13 y Yap (1978) Nature 273: 238 y Nature (1979) 277: 108); virus de la inmunodeficiencia humana como se describe en el documento EP-0386882 y en Buchschacher (1992) J. Virol. 66: 2731; virus del sarampión, por ejemplo ATCC VR-67 y VR-1247 y los descritos en el documento EP-0440219; virus Aura, por ejemplo ATCC VR-368; virus Bebaru, por ejemplo ATCC VR-600 y ATCC VR-1240; virus Cabassou, por ejemplo ATCC VR-922; virus Chikungunya, por ejemplo ATCC VR-64 y ATCC VR-1241; Virus Fort Morgan, por ejemplo ATCC VR-924; virus Getah, por ejemplo ATCC VR-369 y ATCC VR-1243; virus Kyzylgach, por ejemplo ATCC VR-927; virus Mayaro, por 20 ejemplo ATCC VR-66; virus Mucambo, por ejemplo ATCC VR-580 y ATCC VR-1244; virus Ndumu, por ejemplo ATCC VR-371; virus Pixuna, por ejemplo ATCC VR-372 y ATCC VR-1245; virus Tonate, por ejemplo ATCC VR-925; Trinit virus, por ejemplo ATCC VR-469; Una virus, por ejemplo ATCC VR-374; Whataroa virus, por ejemplo ATCC VR-926; virus Y-62-33, por ejemplo ATCC VR-375; O'Nyong virus, virus de la encefalitis oriental, por ejemplo, por ejemplo ATCC VR-65 y ATCC VR-1242; virus de la encefalitis occidental, por ejemplo ATCC VR-70, ATCC VR-1251, 25 ATCC VR-622 y ATCC VR-1252; y coronavirus, por ejemplo ATCC VR-740 y los descritos en Hamre (1966) Proc Soc Exp Biol Med 121: 190.

La administración de las composiciones de la presente invención en las células no está limitada a los vectores virales anteriormente mencionados. Pueden emplearse otros procedimientos y medios de administración 30 tales como, por ejemplo, vectores de expresión de ácidos nucleicos, ADN policatiónico condensado ligado o no ligado a adenovirus destruidos en solitario, véase, por ejemplo, el documento con N° de Serie de Estados Unidos 08/366.787, presentado el 30 de diciembre 1994 y Curiel (1992) Hum Gene Ther 3: 147-154 ligand linked DNA, por ejemplo véase Wu (1989) J Biol Chem 264: 16985-16987, vehículos celulares de administración de células eucariotas, véase, por ejemplo, el documento de Estados Unidos con N° de Serie 08/240.030, presentado el 9 de 35 mayo de 1994 y el documento de Estados Unidos con N° de Serie 08/404.796, deposición de materiales de hidrogel fotopolimerizados, pistola manual de partículas para transferencia de genes, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.149.655, radiación ionizante como se describe en el documento US 5.206.152 y en WO92/11033, neutralización de carga de núcleo o fusión con membranas celulares. Otras estrategias se describen en Philip (1994) Mol Cell Biol 14: 2411-2418 y en Woffendin (1994) Proc Natl Acad Sci 91: 1581-1585.

Puede emplearse transferencia de genes mediada por partículas, véase, por ejemplo, el documento de Estados Unidos con N° de Serie 60/023.867. Resumiendo, la secuencia puede insertarse en vectores convencionales que contienen secuencias de control convencionales para una expresión de alto nivel, y después 45 incubarse con moléculas de transferencia de genes sintéticos tal como cationes de unión de ADN polimérico como polilisina, protamina y albúmina, unido con ligandos de diana celular tales como asialoorosomucoide, como se describe en Wu y Wu (1987) J. Biol. Chem. 262: 4429-4432, insulina, como se describe en Hucked (1990) Biochem Pharmacol 40: 253-263, galactosa, como se describe en Plank (1992) Bioconjugate Chem 3: 533-539, lactosa o transferrina.

50 También puede emplearse ADN desnudo. Los procedimientos de introducción de ADN desnudo ejemplares se describen en los documentos WO 90/11092 y US 5.580.859. La eficacia de la captación puede mejorarse usando perlas de látex biodegradable. Las perlas de látex recubiertas de ADN se transportan eficazmente al interior de las células después de iniciar la endocitosis mediante las perlas. El procedimiento puede mejorarse aún más por 55 tratamiento de las perlas para aumentar la hidrofobicidad y, de esta forma, facilitar la rotura del endosoma y la liberación del ADN en el citoplasma.

Los liposomas pueden actuar como vehículos de administración de genes, como se describe en los documentos US 5.422.120, WO95/13796, WO94/23697, WO91/144 y EP-524.968. Como se describe en el 60 documento USSN. 60/023.867, sobre la administración no viral, las secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido pueden insertarse en vectores convencionales que contienen secuencias de control convencionales para una expresión elevada y después incubarse con moléculas de transferencia de genes sintéticos tales como cationes de unión de ADN polimérico como polilisina, protamina y albúmina, unido a ligandos de diana celular tales como asialoorosomucoide, insulina, galactosa, lactosa o transferrina. Otros sistemas de administración incluyen el uso de liposomas para encapsular el ADN que comprende el gen bajo el control de una diversidad de promotores 65 específicos tisulares o activos ubicuos. Otra administración no viral adecuada para su uso incluye los sistemas de liberación mecánica tal como la hipótesis descrita en Woffendin y col (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(24):

11581-11585. Además, la secuencia codificante y el producto de expresión de esta pueden liberarse mediante deposición de materiales de hidrogel fotopolimerizados. Otros procedimientos convencionales para la administración de genes que pueden usarse para administrar la secuencia codificante incluyen, por ejemplo, el uso de una pistola manual para la transferencia de partículas de gen, como se describe en el documento US 5.149.655; el uso de radiación ionizante para activar el gen transferido, como se describe en los documentos US 5.206.152 y WO92/11033.

Se describen liposomas y vehículos de administración de genes policatiónicos ejemplares en las patentes de Estados Unidos 5.422.120 y 4.762.915; en los documentos WO 95/13796; WO94/23697; y WO91/14445; en EP-0524968; y en Stryer, Biochemistry, páginas 236-240 (1975) W.H. Freeman, San Francisco; Szoka (1980) Biochem Biophys Acta 600: 1; Bayer (1979) Biochem Biophys Acta 550: 464; Rivnay (1987) Meth Enzymol 149: 119; Wang (1987) Proc Natl Acad Sci 84: 7851; Plant (1989) Anal Biochem 176: 420.

Una composición de polinucleótido puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de un vehículo de terapia génica, según los términos definidos anteriormente. A efectos de la presente invención, una dosis eficaz estará comprendida entre aproximadamente 0,01 mg/ kg a 50 mg/kg o entre 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de las construcciones de ADN en el individuo al cual se administran.

Procedimientos de administración.

Una vez formuladas, las composiciones de polinucleótidos de la invención pueden administrarse (1) directamente al sujeto; (2) administrarse ex vivo, a células derivadas del sujeto; o (3) in vitro para la expresión de proteínas recombinantes. Los sujetos a tratar pueden ser mamíferos o aves. Además, pueden tratarse sujetos humanos.

La administración directa de las composiciones se realizará habitualmente mediante inyección, por vía tanto subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o se administrará en el espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también pueden administrarse en el interior de una lesión. Otros procedimientos de administración incluyen la administración oral y pulmonar, supositorios y aplicaciones transdérmicas o transcutáneas (véase por ejemplo el documento WO98/20734), agujas y pistolas génicas o hipopulverizadores. La dosificación del tratamiento puede ser una pauta posológica de una sola dosis o de múltiples dosis.

En la técnica se conocen procedimientos para la administración y reimplantación ex vivo de células transformadas en un sujeto y se describen, por ejemplo, en el documento WO93/14778. Los ejemplos de células útiles en aplicaciones ex vivo incluyen, por ejemplo, células madre, particularmente células hematopoyéticas, linfáticas, macrófagos, dendríticas o tumorales.

Generalmente, la administración de ácidos nucleicos para aplicaciones ex vivo e in vivo puede conseguirse mediante los siguientes procedimientos, por ejemplo, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polipreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación de polinucleótido (o polinucleótidos) en liposomas y microinyección directa de ADN en los núcleos, todos ellos bien conocidos en la técnica.

Composiciones farmacéuticas de polinucleótido y polipéptido

Además de los vehículos y sales farmacéuticamente aceptables descritos anteriormente, pueden usarse los siguientes agentes con las composiciones de polinucleótido y/o polipéptido.

A. Polipéptidos

Un ejemplo son polipéptidos que incluyen, sin limitación: asioloorosomucoide (ASOR); transferrina; asialoglicoproteínas; anticuerpos; fragmentos de anticuerpo; ferritina; interleucinas; interferones; factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de células madre y eritropoyetina. También pueden usarse antígenos virales, tales como proteínas de la envoltura. Igualmente, proteínas de otros organismos invasores, tales como el péptido 17 de aminoácidos procedente de la proteína de Plasmodium falciparum conocido como RII.

B. Hormonas, vitaminas, etc.

Otros grupos que pueden incluirse son, por ejemplo: hormonas, esteroides, andrógenos, estrógenos, hormona tiroidea o vitaminas, ácido fólico.

C. Polialquilenos, polisacáridos, etc.

Igualmente puede incluirse el polialquilenglicol entre los polinucleótidos/polipéptidos deseados. En una forma de realización preferida, el polialquilenglicol es polietilenglicol. Además, puede incluirse mono-, di-, o

polisacáridos. En una forma de realización preferida de este aspecto, el polisacárido es dextrano o DEAE-dextrano. Del mismo modo, quitosan y poli(láctido-co-glicólido)

D. Lípidos y liposomas

5 El polinucleótido/polipéptido deseado puede encapsularse también en lípidos o empaquetarse en liposomas antes de administrarlos al sujeto, o a las células derivadas de las anteriores.

10 La encapsulación en lípidos se realiza generalmente usando liposomas que enlazan o atrapan de forma estable y retienen el ácido nucleico. La relación de polinucleótido condensado con respecto a preparación lipídica puede variar pero generalmente estará comprendida en aproximadamente 1:1 (mg ADN:micromoles de lípido) o más lípido. Para una revisión del uso de liposomas como vehículos para la administración de ácidos nucleicos, véase, Hug y Sleight (1991) *Biochim. Biophys. Acta.* 1097: 1-17; Straubinger (1983) *Meth. Enzymol.* 101: 512-527.

15 Las preparaciones liposomales para su uso en la presente invención incluyen preparaciones catiónicas (cargadas positivamente), aniónicas (cargadas negativamente) y neutras. Se ha demostrado que los liposomas catiónicos median la administración intracelular de ADN de plásmido (Felgner (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413- 7416); ARNm (Malone (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6077-6081); y factores de transcripción purificados (Debs (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 10189-10192) en forma funcional.

20 Los liposomas catiónicos se encuentran fácilmente disponibles. Por ejemplo, los liposomas de N[1-2,3-dioleiloxi]propil]-N,N,N-trietilamonio (DOTMA) se encuentran disponible con el nombre comercial Lipofectin de GIBCO BRL, Grand Island, NY. (Véase también Felgner, citado anteriormente). Otros liposomas disponibles en el mercado incluyen transfectace (DDAB/DOPE) y DOTAP/DOPE (Boehringer). Otros liposomas catiónicos pueden prepararse a partir de materiales fácilmente disponibles usando técnicas bien conocidas en la técnica véase, por ejemplo, Szoka (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4194-4198; WO90/11092 para una descripción de la síntesis de liposomas DOTAP (1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio)propano).

25 De manera similar, los liposomas aniónicos y neutros se encuentran fácilmente disponibles, tales como los de Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL) o pueden prepararse a partir de materiales fácilmente disponibles. Dichos materiales incluyen fosfatidil colina, colesterol, fosfatidil etanolamina, dioleoilfosfatidil colina (DOPC), dioleoilfosfatidil glicerol (DOPG), dioleoilfosfatidil etanolamina (DOPE), entre otros. Estos materiales pueden mezclarse también con los materiales de partida DOTMA y DOTAP en las relaciones adecuadas. Los procedimientos de producción de liposomas usando estos materiales son bien conocidos en la técnica.

30 Los liposomas pueden comprender vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequeñas (SUV) o vesículas unilamelares grandes (LUV). Los diferentes complejos liposoma-ácido nucleico se preparan usando procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Straubinger (1983) *Meth. Immunol.* 101: 512-527; Szoka (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4194-4198; Papahadjopoulos (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 394: 483; Wilson (1979) *Cell* 17: 77; Deamer y Bangham (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 443: 629; Ostro (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76: 836; Fraley (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3348); Enoch y Strittmatter (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 145; Fraley (1980) *J. Biol. Chem.* (1980) 255: 10431; Szoka y Papahadjopoulos (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 145; y Schaefer-Ridder (1982) *Science* 215: 166.

E. Lipoproteínas

45 Además, en el polinucleótido/polipéptido a administrar pueden incluirse lipoproteínas. Entre los ejemplos de lipoproteínas a utilizar se incluyen: quilomicrones, HDL, IDL, LDL y VLDL. También pueden usarse mutantes, fragmentos o fusiones de estas proteínas. Del mismo modo, pueden usarse modificaciones de lipoproteínas de origen natural, tales como LDL acetilado. Estas lipoproteínas pueden dirigir la liberación de polinucleótidos a las células que expresan receptores de lipoproteína. Preferentemente, si con el polinucleótido a administrar se incluyen las lipoproteínas, no se incluye ningún otro ligando o diana en la composición.

50 Las lipoproteínas de origen natural comprenden una parte lipídica y una parte proteica. La parte proteica se denomina apoproteína. Hasta ahora, se han aislado e identificado las apoproteínas A, B, C, D y E. Al menos dos de estas contienen varias proteínas, denominadas con los numerales romanos AI, AII, AIV; CI, CII, CIII.

55 Una lipoproteína puede comprender más de una apoproteína. Por ejemplo, los quilomicrones de origen natural comprenden A, B, C y E, con el tiempo, estas proteínas pierden A y adquieren C y E. El VLDL comprende las apoproteínas A, B, C y E, el LDL comprende la apoproteína B; y el HDL comprende las apoproteínas A, C y E.

60 Los aminoácidos de estas apoproteínas son conocidos y se describen, por ejemplo, en Breslow (1985) *Annu Rev. Biochem* 54: 699; Law (1986) *Adv. Exp Med. Biol.* 151: 162; Chen (1986) *J Biol Chem* 261: 12918; Kane (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2465; y Utermann (1984) *Hum Genet* 65: 232.

65

Las lipoproteínas contienen diversos lípidos, incluyendo triglicéridos, colesterol (libre y ésteres) y fosfolípidos. La composición de los lípidos varía en las lipoproteínas de origen natural. Por ejemplo, los quilomicrones de origen natural comprenden principalmente triglicéridos. Una descripción más detallada del contenido en lípidos de las lipoproteínas de origen natural se encuentra, por ejemplo, en Meth. Enzymol. 128 (1986). La composición de lípidos se selecciona para facilitar la conformación de la apoproteína para la actividad de enlace del receptor. La composición de los lípidos puede seleccionarse también para facilitar la interacción hidrófoba y la asociación con la molécula de enlace del polinucleótido.

Las lipoproteínas de origen natural pueden aislarse del suero, por ejemplo, mediante ultra centrifugación. Dichos procedimientos se describen en Meth. Enzymol. (citado anteriormente); Pitas (1980) J. Biochem. 255: 5454-5460 y Mahey (1979) J Clin. Invest 64: 743-750. Las lipoproteínas también pueden producirse in vitro o mediante procedimientos de recombinación mediante la expresión de los genes de la apoproteína en una célula huésped deseada. Véase, por ejemplo, Atkinson (1986) Annu Rev Biophys Chem 15: 403 y Radding (1958) Biochim Biophys Acta 30: 443. Las lipoproteínas pueden conseguirse también a partir de proveedores comerciales, tales como Biomedical Technologies, Inc., Stoughton, Massachusetts, Estados Unidos. En el documento WO98/06437 puede encontrarse una descripción adicional de las apoproteínas.

F. Agentes policatiónicos

En una composición con el polinucleótido/polipéptido deseado a administrar pueden incluirse agentes policatiónicos, con o sin lipoproteína.

Los agentes policatiónicos, normalmente, muestran una carga positiva neta a pH fisiológicamente relevante y pueden neutralizar la carga eléctrica de los ácidos nucleicos para facilitar la administración en una localización deseada. Estos agentes tienen aplicaciones tanto in vitro, ex vivo como in vivo. Los agentes policatiónicos pueden usarse para administrar ácidos nucleicos a un sujeto vivo por vía intramuscular, subcutánea, etc.

A continuación se indican ejemplos de polipéptidos útiles como agentes policatiónicos: polilisina, poliarginina, poliornitina y protamina. Otros ejemplos incluyen histonas, protaminas, albúmina de suero humano, proteínas de enlace con el ADN, proteínas cromosómicas no histona, proteínas de recubrimiento procedentes de virus de ADN tales como X174, factores transcripcionales que también contienen regiones que se unen al ADN y por tanto pueden ser útiles como agentes de condensación de ácidos nucleicos. Resumiendo, los factores transcripcionales tales como C/CEBP, c-jun, c-fos, AP-1, AP-2, AP-3, CPF, Prot-1, Sp-1, Oct-1, Oct-2, CREP y TFIIID contienen regiones básicas que se unen con secuencias de ADN.

Los agentes policatiónicos orgánicos incluyen: espermina, espermidina y putrescina.

Las dimensiones y propiedades físicas de un agente policatiónico pueden extrapolarse de la lista anterior para construir otros agentes policatiónicos de polipéptido o producir agentes policatiónicos sintéticos.

Los agentes policatiónicos sintéticos que son útiles que incluyen, por ejemplo, DEAE-dextrano, polibreno, Lipofectin™ y lipofectAMINE™, son monómeros que forman complejos policatiónicos cuando se combinan con los polinucleótidos/polipéptidos.

Ensayos de inmunodiagnóstico

Los antígenos de Neisseria de la invención pueden usarse en inmunoensayos para detectar niveles de anticuerpo (o, de manera inversa, pueden usarse anticuerpos anti-Neisseria para detectar niveles de antígenos). Pueden desarrollarse inmunoensayos basados en antígenos recombinantes bien definidos para sustituir procedimientos de diagnóstico invasivos. Pueden detectarse anticuerpos frente a proteínas de Neisseria en muestras biológicas incluyendo, por ejemplo, muestras de sangre o suero. El diseño de los inmunoensayos está sometido a un elevado nivel de variación, y una diversidad de estos son bien conocidos en la técnica. Los protocolos de inmunoensayo pueden basarse, por ejemplo, en ensayos de tipo competitivo, o de reacción directa, o de tipo sándwich. Los protocolos también pueden usar, por ejemplo, soportes sólidos o pueden realizarse mediante inmunoprecipitación. La mayor parte de los ensayos implican el uso de anticuerpos o polipéptidos marcados, las etiquetas pueden ser, por ejemplo, moléculas fluorescentes, quimioluminiscentes, radioactivas o de tinción. Se conocen también ensayos que amplifican las señales de la sonda; son ejemplos de dichos ensayos los que utilizan biotina y avidina y enzimas marcadas e inmunoensayos mediados, tales como ensayos ELISA.

Se construyen kits adecuados para inmunodiagnóstico y que contienen los reactivos marcados apropiados envasando los materiales adecuados, incluyendo las composiciones de la invención, en recipientes adecuados, junto con el resto de materiales y reactivos (por ejemplo, tampones adecuados, soluciones salinas, etc.) necesarios para la realización del ensayo así como un conjunto de instrucciones de ensayo deseable.

Hibridación de ácidos nucleicos

“Hibridación” se refiere a la asociación de dos secuencias de ácidos nucleicos, estando una secuencia fija a un soporte sólido y la otra libre en solución. A continuación, las dos secuencias se ponen en contacto entre sí en condiciones que favorecen la formación de puentes de hidrógeno. Los factores que afectan a este enlace incluyen; el tipo y volumen del disolvente; la temperatura de la reacción, el tiempo de hibridación, la agitación, agentes que bloquean el enlace no específico de la fase líquida con el soporte sólido (reactivo de Denhardt o BLOTTO); concentración de secuencias; uso de los compuestos para aumentar la velocidad de asociación de las secuencias (sulfato de dextrano o polietilenglicol); y la rigurosidad de las condiciones de lavado tras la hibridación. Véase Sambrook y col. [citado anteriormente] volumen 2, capítulo 9, páginas 9,47 a 9,57.

“Rigurosidad” se refiere a las condiciones de la reacción de hibridación que favorecen la asociación de secuencias muy similares sobre las secuencias que se diferencian. Por ejemplo, la combinación de temperatura y concentración de sales debe seleccionarse de manera que esté entre 120 y 200 °C por debajo de la T_m calculada del híbrido sometido a estudio. Las condiciones de temperatura y sal a menudo pueden determinarse de manera empírica en experimentos preliminares en los que las muestras de ADN genómico inmovilizadas sobre filtros se hibridan con la secuencia de interés y después se lavan en condiciones de rigurosidad diferentes. Véase Sambrook et al. En la página 9, 50.

Cuando se realiza, por ejemplo, una transferencia de Southern, las variables a tener en cuenta son (1) la complejidad del ADN que se transfiere y (2) la homología entre la sonda y las secuencias a detectar. La cantidad total del fragmento (o fragmentos) a estudiar puede variar en una magnitud de 10, de 0,1 a 1 µg para una digestión de plásmido o fago, de 10⁻⁹ a 10⁻⁸ g para un gen de copia única en un genoma de eucariota muy complejo. Para polinucleótidos de baja complejidad pueden usarse tiempos de transferencia, hibridación y exposición, considerablemente más cortos, una menor cantidad de polinucleótidos de partida y una menor actividad específica de las sondas. Por ejemplo, puede detectarse un gen de levadura de copia única con un tiempo de exposición de solo 1 hora a partir de 1 µg de ADN, transferencia de dos horas e hibridación durante 4-8 horas con una sonda de 10⁸ cpm/µg. Para un gen de mamífero de copia única, se iniciaría una estrategia conservativa con 10 µg de ADN, transferencia durante una noche e hibridación durante una noche con sulfato de dextrano al 10% usando una sonda mayor de 10⁸ cpm/µg, dando como resultado un tiempo de exposición de -24 horas.

Varios factores pueden afectar a la temperatura de fusión (T_m, melting Time) de un híbrido ADN-ADN entre la sonda y el fragmento de interés, y por tanto, las condiciones apropiadas para la hibridación y lavado. En muchos casos, la sonda no es homóloga al 100% con el fragmento. Otras variables normalmente presentes incluyen la longitud y contenido total de G+C de las secuencias hibridantes y la fuerza iónica y contenido en formamida del tampón de hibridación. Los efectos de todos estos factores pueden aproximarse mediante una ecuación sencilla.

$$T_m = 81 + 16,6(\log_{10} C_i) + 0,4[\%(G + C)] - 0,6(\text{formamida } \%) - 600/n - 1,5(\% \text{ de no emparejamiento})$$

en la que C_i es la concentración salina (iones monovalentes) y n es la longitud del híbrido en pares de bases (ligeramente modificado a partir de Meinkoth y Wahl (1984) Anal. Biochem. 138: 267-284).

Para diseñar un experimento de hibridación, deben modificarse de manera conveniente diversos factores que afectan a la hibridación del ácido nucleico. La temperatura de hibridación y lavado y la concentración salina durante los lavados son los más sencillos de ajustar. A medida que aumenta la temperatura de hibridación (es decir, la rigurosidad), la hibridación se produce menos fácilmente entre cadenas que no son homólogas y como resultado, el fondo disminuye. Si la sonda radiomarcada y el fragmento inmovilizado no son completamente homólogos (caso frecuente en experimentos de hibridación en familias de genes y entre especies) la temperatura de hibridación debe reducirse y el fondo disminuirá. La temperatura de los lavados afecta, de manera similar, a la intensidad de la banda de hibridación y al nivel de fondo. La rigurosidad de los lavados aumenta también con la disminución de las concentraciones salinas.

En general, las temperaturas de hibridación convenientes en presencia de formamida al 50% son de 42 °C para una sonda con una homología del 95% al 100% con respecto al fragmento diana, de 37 °C para una homología del 90% al 95% y de 32 °C para una homología del 85% al 90%. Para homologías más bajas, el contenido en formamida debe disminuirse y la temperatura debe ajustarse de acuerdo con ello, usando la ecuación anterior. Si no se conoce la homología entre la sonda y el fragmento diana, la estrategia más sencilla es comenzar con condiciones tanto de hibridación como de lavado que no sean rigurosas. Si se observan bandas no específicas, o un fondo elevado tras la auto radiografía, el filtro puede lavarse con una rigurosidad elevada y volver a exponerse. Si el tiempo necesario para la exposición hace que esta estrategia no sea factible, deben ensayarse en paralelo diferentes rigurosidades de hibridación y/o de lavado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra un árbol filogenético

La Figura 2 muestra un alineamiento ofrecido por BOXSHADE de la 953.

EJEMPLOS

5 El documento WO99/36544 desvela la clonación y expresión de una proteína Neisserial denominada "953".
 La proteína y secuencias de ADN de los serogrupos A y B de N.meningitidis se desvelan, junto con las secuencias de N.gonorrhoeae.

10 La 953 ha sido secuenciada de una población de referencia de 8 cepas de los serogrupos A, B y C de la N.meningitidis. Una alineación de estas secuencias se muestra en la Figura 2, de la que son evidentes tramos de aminoácidos conservados. La proteína también está bien conservada.

Las regiones conservadas de interés particular son:

15 MKKIIFAALAAAVGTASAATYKVDEYHANARFAIDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDIT
 IP (I/V) ANLQSGSQHFTHLKSADIFDAAQYPDIRFVSTKFNFNKGKLVSDGNLTMHGKTAPVKLK
 AEKFNCYQSPM
 20 -
 ATYKVDEYHANARFAIDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDITIP (I/V) ANLQSGSQHFTHLKSADIFDAAQYPDIRFVSTKFNFNKGKLVSDGNLTMHGKTAPVKLKA
 25 - KTEVCGGDFSTTIDRTKWG(M/V)DYLNVNMGMTKSVRIDIQIEAAKQ

30 Las regiones conservadas en la 953 confirman que los fragmentos de esta proteína son adecuados para vacunas multi-específicas o reactivos de diagnóstico.

Árbol filogenético

35 La Figura 1 es un dendrograma que muestra la relación genética entre 107 cepas de N.meningitidis, en base a análisis MLST de seis fragmentos de genes (adaptado de Maiden y col. (1998) PNAS USA 95:3140). El dendrograma puede ser usados para seleccionar cepas representativas del serogrupo B meningocócico (flechas). Cinco cepas adicionales, para las que se han determinado independientemente asignación a linajes hipervirulentos por Wang y col. (J.Infect.Dis (1993) 167:1320), Seiler y col. (Mol.Microbiol. (1996) 19:841), and Virji y col. (Mol.Microbiol. (1992) 6:1271) están superpuestas en el dendrograma e indicadas por asteriscos. Además de las 22 cepas de MenB, se usaron tres cepas de MenA, dos cepas de MenC, y una cepa de cada una de Men Y, X, Z y W135. Estas están indicadas por letras en negrita antes del nombre. Cuando no había disponibles datos filogenéticos, las cepas se muestran fuera del árbol. Las cepas hipervirulentas ET-5, ET-37 e IV-1 están indicadas.

LISTADOS DE SECUENCIAS

45 <110> Novartis Vaccines and Diagnostics S.r.l.
 <120> CONSERVED NEISSERIAL ANTIGENS
 50 <130> P055378EP
 <140> EP-
 <141> 2000-04-28
 55 <150> GB-0005728.1
 <151> 1999-04-30
 <150> GB-9910168.5
 60 <151> 2000-03-09
 <150> PCT/IB00/00642
 <151> 2000-04-28
 65 <150> EP-00922818.0
 <151> 2000-04-28

ES 2 477 194 T3

<160> 11
 <170> SeqWin2010, version 1.0

5 <210> 1
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

10 <400> 1

15 Met Lys Lys Ile Ile Ile Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Val Gly Thr
 1 5 10 15

20 Ala Ser Ala Ala Thr Tyr Lys Val Asp Glu Tyr His Ala Asn Ala Arg
 20 25 30

25 Phe Ala Ile Asp His Phe Asn Thr Ser Thr Asn Val Gly Gly Phe Tyr
 35 40 45

30 Gly Leu Thr Gly Ser Val Glu Phe Asp Gln Ala Lys Arg Asp Gly Lys
 50 55 60

35 Ile Asp Ile Thr Ile Pro Val Ala Asn Leu Gln Ser Gly Ser Gln His
 65 70 75 80

40 Phe Thr Asp His Leu Lys Ser Ala Asp Ile Phe Asp Ala Ala Gln Tyr
 85 90 95

45 Pro Asp Ile Arg Phe Val Ser Thr Lys Phe Asn Phe Asn Gly Lys Lys
 100 105 110

50 Leu Val Ser Val Asp Gly Asn Leu Thr Met His Gly Lys Thr Ala Pro
 115 120 125

55 Val Lys Leu Lys Ala Glu Lys Phe Asn Cys Tyr Gln Ser Pro Met Glu
 130 135 140

60 Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly Asp Phe Ser Thr Thr Ile Asp Arg Thr
 145 150 155 160

65 Lys Trp Gly Val Asp Tyr Leu Val Asn Val Gly Met Thr Lys Ser Val
 165 170 175

70 Arg Ile Asp Ile Gln Ile Glu Ala Ala Lys Gln
 180 185

75 <210> 2
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

80 <400> 2

ES 2 477 194 T3

5 Met Lys Lys Ile Ile Phe Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Val Gly Thr
1 5 10

Ala Ser Ala Ala Thr Tyr Lys Val Asp Glu Tyr His Ala Asn Ala Arg
20 25 30

10 Phe Ala Ile Asp His Phe Asn Thr Ser Thr Asn Val Gly Gly Phe Tyr
35 40 45

15 Gly Leu Thr Gly Ser Val Glu Phe Asp Gln Ala Lys Arg Asp Gly Lys
50 55 60

20 Ile Asp Ile Thr Ile Pro Val Ala Asn Leu Gln Ser Gly Ser Gln His
65 70 75 80

Phe Thr Asp His Leu Lys Ser Ala Asp Ile Phe Asp Ala Ala Gln Tyr
85 90 95

25 Pro Asp Ile Arg Phe Val Ser Thr Lys Phe Asn Phe Asn Gly Lys Lys
100 105 110

30 Leu Val Ser Val Asp Gly Asn Leu Thr Met His Gly Lys Thr Ala Pro
115 120 125

35 Val Lys Leu Lys Ala Glu Lys Phe Asn Cys Tyr Gln Ser Pro Met Glu
130 135 140

Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly Asp Phe Ser Thr Thr Ile Asp Arg Thr
145 150 155 160

40 Lys Trp Gly Val Asp Tyr Leu Val Asn Val Gly Met Thr Lys Ser Val
165 170 175

45 Arg Ile Asp Ile Gln Ile Glu Ala Ala Lys Gln
180 185

<210> 3
<211> 187
<212> PRT
50 <213> Neisseria meningitidis
<400> 3

55 Met Lys Lys Ile Ile Phe Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Val Gly Thr
1 5 10

Ala Ser Ala Ala Thr Tyr Lys Val Asp Glu Tyr His Ala Asn Ala Arg
20 25 30

60 Phe Ala Ile Asp His Phe Asn Thr Ser Thr Asn Val Gly Gly Phe Tyr
35 40 45

65

ES 2 477 194 T3

5 Gly Leu Thr Gly Ser Val Glu Phe Asp Gln Ala Lys Arg Asp Gly Lys
50 55 60

10 Ile Asp Ile Thr Ile Pro Val Ala Asn Leu Gln Ser Gly Ser Gln His
65 70 75 80

15 Phe Thr Asp His Leu Lys Ser Ala Asp Ile Phe Asp Ala Ala Gln Tyr
85 90 95

20 Pro Asp Ile Arg Phe Val Ser Thr Lys Phe Asn Phe Asn Gly Lys Lys
100 105 110

25 Leu Val Ser Val Asp Gly Asn Leu Thr Met His Gly Lys Thr Ala Pro
115 120 125

30 Val Lys Leu Lys Ala Glu Lys Phe Asn Cys Tyr Gln Ser Pro Met Ala
130 135 140

35 Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly Asp Phe Ser Thr Thr Ile Asp Arg Thr
145 150 155 160

40 Lys Trp Gly Val Asp Tyr Leu Val Asn Val Gly Met Thr Lys Ser Val
165 170 175

45 Arg Ile Asp Ile Gln Ile Glu Ala Ala Lys Gln
180 185

50 <210> 4
<211> 187
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis

55

60

65 <400> 4

ES 2 477 194 T3

5 Met Lys Lys Ile Ile Phe Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Val Gly Thr
 1 5 10
 10 Ala Ser Ala Ala Thr Tyr Lys Val Asp Glu Tyr His Ala Asn Ala Arg
 20 25 30
 15 Phe Ala Ile Asp His Phe Asn Thr Ser Thr Asn Val Gly Gly Phe Tyr
 35 40 45
 20 Gly Leu Thr Gly Ser Val Glu Phe Asp Gln Ala Lys Arg Asp Gly Lys
 50 55 60
 25 Ile Asp Ile Thr Ile Pro Val Ala Asn Leu Gln Ser Gly Ser Gln His
 65 70 75
 30 Phe Thr Asp His Leu Lys Ser Ala Asp Ile Phe Asp Ala Ala Gln Tyr
 85 90 95
 35 Pro Asp Ile Arg Phe Val Ser Thr Lys Phe Asn Phe Asn Gly Lys Lys
 100 105 110
 40 Leu Val Ser Val Asp Gly Asn Leu Thr Met His Gly Lys Thr Ala Pro
 115 120 125
 45 Val Lys Leu Lys Ala Glu Lys Phe Asn Cys Tyr Gln Ser Pro Met Ala
 130 135 140
 50 Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly Asp Phe Ser Thr Thr Ile Asp Arg Thr
 145 150 155 160
 55 Lys Trp Gly Val Asp Tyr Leu Val Asn Val Gly Met Thr Lys Ser Val
 165 170 175
 60 Arg Ile Asp Ile Gln Ile Glu Ala Ala Lys Gln
 180 185

<210> 5
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

<400> 5

55

60

65

ES 2 477 194 T3

5 Met Lys Lys Ile Ile Phe Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Val Gly Thr
 1 5 10 15

Ala Ser Ala Ala Thr Tyr Lys Val Asp Glu Tyr His Ala Asn Ala Arg
 20 25 30

10 Phe Ala Ile Asp His Phe Asn Thr Ser Thr Asn Val Gly Gly Phe Tyr
 35 40 45

15 Gly Leu Thr Gly Ser Val Glu Phe Asp Gln Ala Lys Arg Asp Gly Lys
 50 55 60

20 Ile Asp Ile Thr Ile Pro Val Ala Asn Leu Gln Ser Gly Ser Gln His
 65 70 75 80

Phe Thr Asp His Leu Lys Ser Ala Asp Ile Phe Asp Ala Ala Gln Tyr
 85 90 95

25 Pro Asp Ile Arg Phe Val Ser Thr Lys Phe Asn Phe Asn Gly Lys Lys
 100 105 110

30 Leu Val Ser Val Asp Gly Asn Leu Thr Met His Gly Lys Thr Ala Pro
 115 120 125

35 Val Lys Leu Lys Ala Glu Lys Phe Asn Cys Tyr Gln Ser Pro Met Ala
 130 135 140

Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly Asp Phe Ser Thr Thr Ile Asp Arg Thr
 145 150 155 160

40 Lys Trp Gly Val Asp Tyr Leu Val Asn Val Gly Met Thr Lys Ser Val
 165 170 175

45 Arg Ile Asp Ile Gln Ile Glu Ala Ala Lys Gln
 180 185

<210> 6
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

50 <400> 6

55 Met Lys Lys Ile Ile Phe Ala Ala Leu Glu Ala Ala Ala Val Gly Thr
 1 5 10 15

60 Ala Ser Ala Ala Thr Tyr Lys Val Asp Glu Tyr His Ala Asn Ala Arg
 20 25 30

Phe Ala Ile Asp His Phe Asn Thr Ser Thr Asn Val Gly Gly Phe Tyr
 35 40 45

65

ES 2 477 194 T3

5 Gly Leu Thr Gly Ser Val Glu Phe Asp Gln Ala Lys Arg Asp Gly Lys
50 55 60

10 Ile Asp Ile Thr Ile Pro Val Ala Asn Leu Gln Ser Gly Ser Gln His
65 70 75 80

15 Phe Thr Asp His Leu Lys Ser Ala Asp Ile Phe Asp Ala Ala Gln Tyr
85 90 95

20 Pro Asp Ile Arg Phe Val Ser Thr Lys Phe Asn Phe Asn Gly Lys Lys
100 105 110

25 Leu Val Ser Val Asp Gly Asn Leu Thr Met His Gly Lys Thr Ala Pro
115 120 125

30 Val Lys Leu Lys Ala Glu Lys Phe Asn Cys Tyr Gln Ser Pro Met Ala
130 135 140

35 Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly Asp Phe Ser Thr Thr Ile Asp Arg Thr
145 150 155 160

40 Lys Trp Gly Val Asp Tyr Leu Val Asn Val Gly Met Thr Lys Ser Val
165 170 175

45 Arg Ile Asp Ile Gln Ile Glu Ala Ala Lys Gln
180 185

40 <210> 7
<211> 187
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis

45 <400> 7

50

55

60

65

ES 2 477 194 T3

5 Met Lys Lys Ile Ile Phe Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Ile Ser Thr
 1 5 10 15
 5 Ala Ser Ala Ala Thr Tyr Lys Val Asp Glu Tyr His Ala Asn Ala Arg
 20 25 30
 10 Phe Ala Ile Asp His Phe Asn Thr Ser Thr Asn Val Gly Gly Phe Tyr
 35 40 45
 15 Gly Leu Thr Gly Ser Val Glu Phe Asp Gln Ala Lys Arg Asp Gly Lys
 50 55 60
 20 Ile Asp Ile Thr Ile Pro Ile Ala Asn Leu Gln Ser Gly Ser Gln His
 65 70 75 80
 25 Phe Thr Asp His Leu Lys Ser Ala Asp Ile Phe Asp Ala Ala Gln Tyr
 85 90 95
 30 Pro Asp Ile Arg Phe Val Ser Thr Lys Phe Asn Phe Asn Gly Lys Lys
 100 105 110
 35 Leu Val Ser Val Asp Gly Asn Leu Thr Met His Gly Lys Thr Ala Pro
 115 120 125
 40 Val Lys Leu Lys Ala Glu Lys Phe Asn Cys Tyr Gln Ser Pro Met Glu
 130 135 140
 45 Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly Asp Phe Ser Thr Thr Ile Asp Arg Thr
 145 150 155 160
 50 <210> 8
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 55 <400> 8
 60
 65

ES 2 477 194 T3

5 Met Lys Lys Ile Ile Ile Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Ile Gly Thr
1 5 10 15

Ala Ser Ala Ala Thr Tyr Lys Val Asp Glu Tyr His Ala Asn Ala Arg
20 25 30

10 Phe Ser Ile Asp His Phe Asn Thr Ser Thr Asn Val Gly Gly Phe Tyr
35 40 45

15 Gly Leu Thr Gly Ser Val Glu Phe Asp Gln Ala Lys Arg Asp Gly Lys
50 55 60

Ile Asp Ile Thr Ile Pro Val Ala Asn Leu Gln Ser Gly Ser Gln His
65 70 75 80

20 Phe Thr Asp His Leu Lys Ser Ala Asp Ile Phe Asp Ala Ala Gln Tyr
85 90 95

25 Pro Asp Ile Arg Phe Val Ser Thr Lys Phe Asn Phe Asn Gly Lys Lys
100 105 110

30 Leu Val Ser Val Asp Gly Asn Leu Thr Met His Gly Lys Thr Ala Pro
115 120 125

Val Lys Leu Lys Ala Glu Lys Phe Asn Cys Tyr Gln Ser Pro Met Leu
130 135 140

35 Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly Asp Phe Ser Thr Thr Ile Asp Arg Thr
145 150 155 160

Lys Trp Gly Met Asp Tyr Leu Val Asn Val Gly Met Thr Lys Ser Val
165 170 175

40 Arg Ile Asp Ile Gln Ile Glu Ala Ala Lys Gln
180 185

45 <210> 9
<211> 143
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis

50 <220>
<221> misc_feature
<222> 71
<223> 'Xaa' es Ile o Val

55 <400> 9

Met Lys Lys Ile Ile Phe Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Val Gly Thr
1 5 10 15

60 Ala Ser Ala Ala Thr Tyr Lys Val Asp Glu Tyr His Ala Asn Ala Arg

65

ES 2 477 194 T3

				20					25					30			
5	Phe	Ala	Ile	Asp	His	Phe	Asn	Thr	Ser	Thr	Asn	Val	Gly	Gly	Phe	Tyr	
				35				40					45				
10	Gly	Leu	Thr	Gly	Ser	Val	Glu	Phe	Asp	Gln	Ala	Lys	Arg	Asp	Gly	Lys	
		50					55					60					
15	Ile	Asp	Ile	Thr	Ile	Pro	Xaa	Ala	Asn	Leu	Gln	Ser	Gly	Ser	Gln	His	
	65					70					75					80	
20	Phe	Thr	Asp	His	Leu	Lys	Ser	Ala	Asp	Ile	Phe	Asp	Ala	Ala	Gln	Tyr	
					85					90					95		
25	Pro	Asp	Ile	Arg	Phe	Val	Ser	Thr	Lys	Phe	Asn	Phe	Asn	Gly	Lys	Lys	
				100					105					110			
30	Leu	Val	Ser	Val	Asp	Gly	Asn	Leu	Thr	Met	His	Gly	Lys	Thr	Ala	Pro	
				115				120					125				
35	Val	Lys	Leu	Lys	Ala	Glu	Lys	Phe	Asn	Cys	Tyr	Gln	Ser	Pro	Met		
		130					135					140					

30 <210> 10
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 52
 <223> 'Xaa' es Ile o Val

40 <400> 10

45

50

55

60

65

ES 2 477 194 T3

5 Ala Thr Tyr Lys Val Asp Glu Tyr His Ala Asn Ala Arg Phe Ala Ile
 1 5 10 15
 Asp His Phe Asn Thr Ser Thr Asn Val Gly Gly Phe Tyr Gly Leu Thr
 20 25 30
 10 Gly Ser Val Glu Phe Asp Gln Ala Lys Arg Asp Gly Lys Ile Asp Ile
 35 40 45
 15 Thr Ile Pro Xaa Ala Asn Leu Gln Ser Gly Ser Gln His Phe Thr Asp
 50 55 60
 His Leu Lys Ser Ala Asp Ile Phe Asp Ala Ala Gln Tyr Pro Asp Ile
 65 70 75 80
 20 Arg Phe Val Ser Thr Lys Phe Asn Phe Asn Gly Lys Lys Leu Val Ser
 85 90 95
 25 Val Asp Gly Asn Leu Thr Met His Gly Lys Thr Ala Pro Val Lys Leu
 100 105 110
 30 Lys Ala Glu Lys Phe Asn Cys Tyr Gln Ser Pro Met
 <210> 11
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20
 <223> 'Xaa' es Met o Val
 40 <400> 11
 45 Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly Asp Phe Ser Thr Thr Ile Asp Arg Thr
 1 5 10 15
 Lys Trp Gly Xaa Asp Tyr Leu Val Asn Val Gly Met Thr Lys Ser Val
 20 25 30
 50 Arg Ile Asp Ile Gln Ile Glu Ala Ala Lys Gln
 35 40
 55
 60
 65

Reivindicaciones

- 5 **1.** Una proteína que comprende un fragmento antigénico de la proteína 953 neisserial
 MKKIIFAALAAA AVGTASATYKVDEYHANVRFAIDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDITI
 PVANLQSGSQPFTGHLKSADIFDAAQYPDIRFVSTKFNFNKGKLVSDGNLTMRGKTAPVKLKAKEFN
 CYQSPMAETEVCGGDFSTTIDRTKWGVDYLVNAGMTKNVRIDIQIEAAKQ;
 MKKIIFAALAAA ISTASAATYKVDEYHANARFAIDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDIT
 10 IPIANLQSGSQHFTHLKSADIFDAAQYPDIRFVSTKFNFNKGKLVSDGNLTMHGKTAPVKLKAKEF
 NCYQSPMEKTEVCGGDFSTTIDRTKWGMDYLVNVGMTKSVRIDIQIEAAKQ; o
 MKKIIIAALAAA IGTASAATYKVDEYHANARFSIDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDIT
 IPVANLQSGSQHFTHLKSADIFDAAQYPDIRFVSTKFNFNKGKLVSDGNLTMHGKTAPVKLKAKEF
 NCYSPMLKTEVCGGDFSTTIDRTKWGMDYLVNVGMTKSVRIDIQIEAAKQ, siempre que dicha proteína no
 comprenda la secuencia
 15 MKKIIFAALAAA AVGTASATYKVDEYHANVRFAIDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDITIP
 VANLQSGSQPFTGHLKSADIFDAAQYPDIRFVSTKFNFNKGKLVSDGNLTMRGKTAPVKLKAKEFN
 QSPMAETEVCGGDFSTTIDRTKWGVDYLVNAGMTKNVRIDIQIEAAKQ;
 MKKIIFAALAAA ISTASAATYKVDEYHANARFAIDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDITI
 20 PIANLQSGSQHFTHLKSADIFDAAQYPDIRFVSTKFNFNKGKLVSDGNLTMHGKTAPVKLKAKEFN
 YQSPMEKTEVCGGDFSTTIDRTKWGMDYLVNVGMTKSVRIDIQIEAAKQ; o
 MKKIIIAALAAA IGTASAATYKVDEYHANARFSIDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDITI
 PVANLQSGSQHFTHLKSADIFDAAQYPDIRFVSTKFNFNKGKLVSDGNLTMHGKTAPVKLKAKEFN
 YSPMLKTEVCGGDFSTTIDRTKWGMDYLVNVGMTKSVRIDIQIEAAKQ, y en donde el mencionado fragmento
 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:
 25
- (a) ATYKVDEYHANARFAIDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDITIP (I/V) ANLQSGS
 QHFTHLKSADIFDAAQYPDIRFVSTKFNFNKGKLVSDGNLTMHGKTAPVKLKAKEFN
 30 (b) KTEVCGGDFSTTIDRTKWG (M/V) DYLVNVGMTKSVRIDIQIEAAKQ.
- 2.** Un ácido nucleico que codifica una proteína de acuerdo con cualquier reivindicación anterior.
- 3.** Un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 2.
- 35 **4.** Una célula huésped transformada con el vector de la reivindicación 3.
- 5.** Una proteína de acuerdo con la reivindicación 1, o el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2, para su uso como un medicamento.
- 40 **6.** El uso de una proteína de acuerdo con la reivindicación 1, o ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2, en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir la infección debida a bacteria Neisserial.
- 7.** El uso de una proteína de acuerdo con la reivindicación 1, o ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2, en la fabricación de un reactivo de diagnóstico multi-específico.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

FIGURA 1

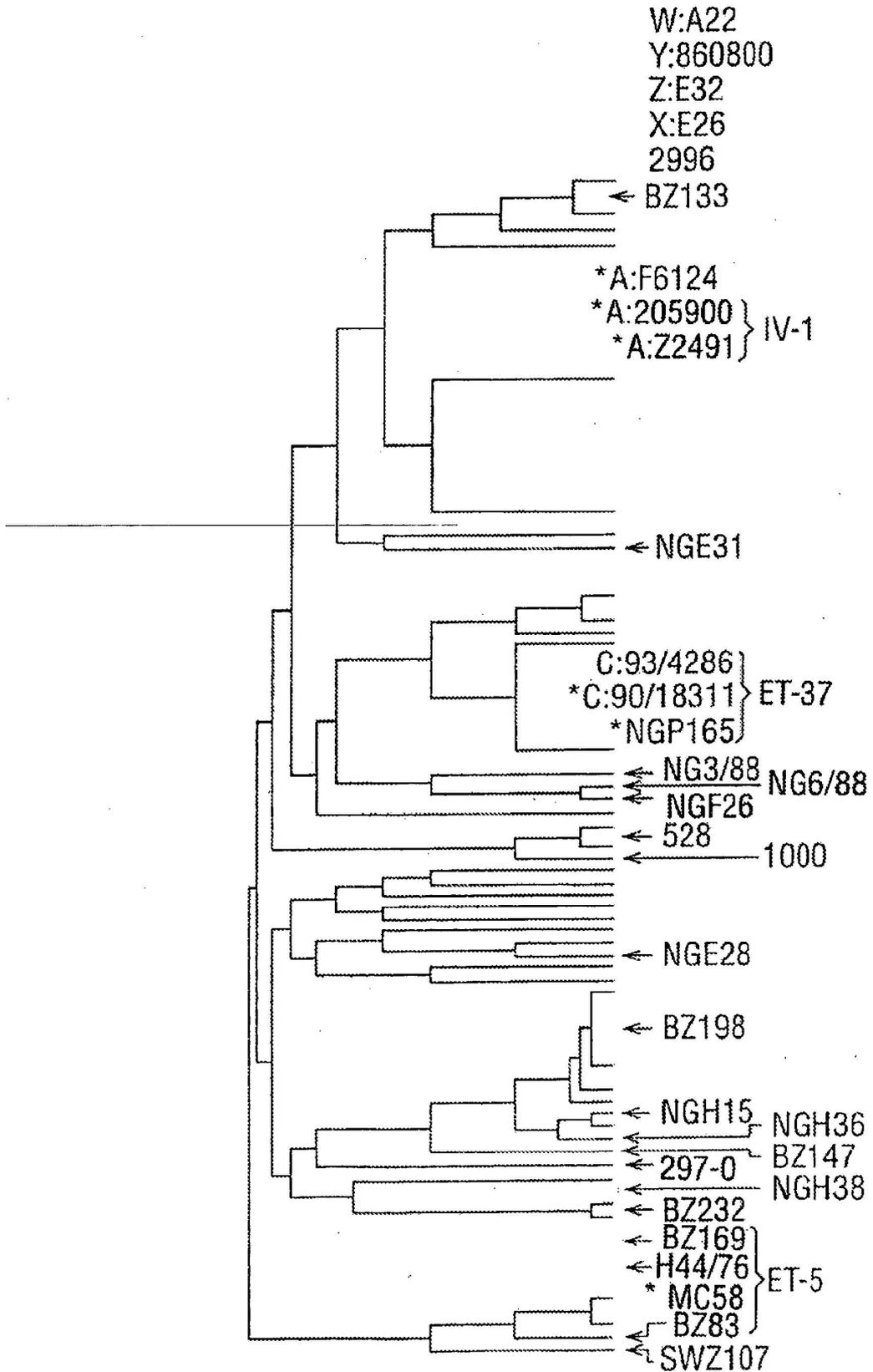


FIGURA 2

1000	1	MKKIIHAAALAAAVGTASAAATYKVD EYHANARFAIDHENTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAK
C11	1	MKKIIFAALAAAVGTASAAATYKVD EYHANARFAIDHENTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAK
2996	1	MKKIIFAALAAAVGTASAAATYKVD EYHANARFAIDHENTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAK
BZ133	1	MKKIIFAALAAAVGTASAAATYKVD EYHANARFAIDHENTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAK
BZ232	1	MKKIIFAALAAAVGTASAAATYKVD EYHANARFAIDHENTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAK
NGH38	1	MKKIIFAALEAAAVGTASAAATYKVD EYHANARFAIDHENTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAK
MC58	1	MKKIIFAALAAAVGTASAAATYKVD EYHANARFAIDHENTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAK
F6124	1	MKKIIFAALAAAVGTASAAATYKVD EYHANARFAIDHENTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAK
1000	61	RDGKIDITIPVANLQSGSQHFTHLKSADIFDAAOQYPPDIRFVSTKFNFGKLLVSVDGNL
C11	61	RDGKIDITIPVANLQSGSQHFTHLKSADIFDAAOQYPPDIRFVSTKFNFGKLLVSVDGNL
2996	61	RDGKIDITIPVANLQSGSQHFTHLKSADIFDAAOQYPPDIRFVSTKFNFGKLLVSVDGNL
BZ133	61	RDGKIDITIPVANLQSGSQHFTHLKSADIFDAAOQYPPDIRFVSTKFNFGKLLVSVDGNL
BZ232	61	RDGKIDITIPVANLQSGSQHFTHLKSADIFDAAOQYPPDIRFVSTKFNFGKLLVSVDGNL
NGH38	61	RDGKIDITIPVANLQSGSQHFTHLKSADIFDAAOQYPPDIRFVSTKFNFGKLLVSVDGNL
MC58	61	RDGKIDITIPVANLQSGSQHFTHLKSADIFDAAOQYPPDIRFVSTKFNFGKLLVSVDGNL
F6124	61	RDGKIDITIPVANLQSGSQHFTHLKSADIFDAAOQYPPDIRFVSTKFNFGKLLVSVDGNL
1000	121	TMHGKTA PVKLLKAEKFNCYQSPMEKTEVCGGDFSTTIDRTKWGVDYLVNVGMTKSVRIDI
C11	121	TMHGKTA PVKLLKAEKFNCYQSPMEKTEVCGGDFSTTIDRTKWGVDYLVNVGMTKSVRIDI
2996	121	TMHGKTA PVKLLKAEKFNCYQSPMEKTEVCGGDFSTTIDRTKWGVDYLVNVGMTKSVRIDI
BZ133	121	TMHGKTA PVKLLKAEKFNCYQSPMEKTEVCGGDFSTTIDRTKWGVDYLVNVGMTKSVRIDI
BZ232	121	TMHGKTA PVKLLKAEKFNCYQSPMEKTEVCGGDFSTTIDRTKWGVDYLVNVGMTKSVRIDI
NGH38	121	TMHGKTA PVKLLKAEKFNCYQSPMEKTEVCGGDFSTTIDRTKWGVDYLVNVGMTKSVRIDI
MC58	121	TMHGKTA PVKLLKAEKFNCYQSPMEKTEVCGGDFSTTIDRTKWGVDYLVNVGMTKSVRIDI
F6124	121	TMHGKTA PVKLLKAEKFNCYQSPMEKTEVCGGDFSTTIDRTKWGVDYLVNVGMTKSVRIDI
1000	181	QIEAAKQ~
C11	181	QIEAAKQ~
2996	181	QIEAAKQ~
BZ133	181	QIEAAKQ~
BZ232	181	QIEAAKQ~
NGH38	181	QIEAAKQ~
MC58	181	QIEAAKQ*
F6124	181	QIEAAKQ~