

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 507 100**

51 Int. Cl.:

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 39/116 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2001 E 07013453 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014 EP 1897555**

54 Título: **Vacuna OMV suplementada contra meningococo**

30 Prioridad:

17.01.2000 GB 0001067

09.03.2000 GB 0005699

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

14.10.2014

73 Titular/es:

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

VIA FIORENTINA 1
53100 SIENA (SI), IT

72 Inventor/es:

PIZZA, MARIAGRAZIA;
RAPPUOLI, RINO y
GIULIANI, MARZIA

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 507 100 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).

DESCRIPCIÓN

Vacuna OMV suplementada contra meningococo

5 CAMPO TECNICO

La presente invención se refiere a vacunas contra el serogrupo B de *Neisseria meningitidis* (NmB).

10 ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

15 *Neisseria meningitidis* es un diplococo patógeno humano Gram-negativo no motil. Coloniza la faringe produciendo meningitis y, ocasionalmente, septicemia en ausencia de meningitis. En los Estados Unidos, el índice de ataque es de 0,6-1 por 100.000 personas por año, y puede ser mucho mayor durante los brotes (véanse Lieberman y col., (1996) JAMA 275 (19):1499-1503; Schuchat y col (1997) N Engl J Med 337 (14): 970-976). En países en desarrollo, las tasas endémicas de la enfermedad son mucho mayores y durante las epidemias, las tasas de incidencia pueden alcanzar 500 casos por 100.000 personas por año. La mortalidad es extremadamente elevada, de un 10-20 % en los Estados Unidos, y mucho mayor en países en desarrollo. Tras la introducción de la vacuna conjugada contra *Haemophilus influenzae*, N. meningitidis es la causa principal de meningitis bacteriana a todas las edades en los Estados Unidos (Schuchat y col (1997) más arriba).

25 Basándose en el polisacárido capsular del organismo, se han identificado 12 serogrupos de N. meningitidis. La vacuna meningocócica actualmente en uso es una vacuna de polisacárido tetravalente compuesta por los serogrupos A, C, Y y W135. Tras el éxito de la vacunación contra H. influenzae, se han desarrollado, sin embargo, las vacunas conjugadas contra los serogrupos A y C.

30 Sin embargo, el serogrupo B sigue siendo un problema, y es actualmente responsable de aproximadamente el 50 % de toda la meningitis en los Estados Unidos, Europa y Sudamérica. No se puede usar la solución del polisacárido debido a que el polisacárido capsular menB es un polímero de ácido N-acetil neuramínico $\alpha(2-8)$ unido que está también presente en tejido de mamíferos. Esto da como resultado tolerancia al antígeno; de forma similar, si se estimuló una respuesta, podría ser contra sí mismo, y por tanto, indeseable. Con el fin de evitar la inducción de la autoinmunidad e inducir una respuesta inmune protectora, el polisacárido capsular tiene, por ejemplo, que modificarse químicamente sustituyendo los grupos N-acetilo con grupos N- propionilo, que mantienen la antigenicidad específica sin alterar (Romero y Outschoorn (1994) Clin Microbiol Rev 7 (4): 559-575).

35 El Instituto nacional Noruego de Salud Pública ha producido una vacuna de vesícula de membrana externa (OMV) eficaz contra el serogrupo B [por ejemplo, Bjune y col. (1991) Lancet 338 (8775): 1093-96]. Aunque esta vacuna es segura y evita la enfermedad por NmB, su eficacia está limitada a la cepa usada para preparar la vacuna. Se ha informado de otras vacunas basadas en preparaciones de membrana externa. Es un objeto de la presente invención ampliar la eficacia de estas vacunas a otras cepas.

40 DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

45 Sorprendentemente, se ha encontrado que la adición de componentes definidos adicionales a vacunas de OMV, amplía significativamente su eficacia.

De esta manera, la presente invención proporciona una composición que comprende (a) una preparación de membrana externa de NmB, y (b) un componente inmunógeno como se define en las reivindicaciones.

50 El componente (b) de la composición es preferiblemente una proteína NmB. Se prefiere que el componente (b) incluya una proteína procedente de una cepa NmB diferente de la que se deriva de la OMV del componente (a), es decir, la OMV en el componente (a) está suplementada preferiblemente por el componente inmunógeno (b) de una cepa NmB diferente.

55 Uno o más de los componentes (o todos ellos) se pueden adsorber en $Al(OH)_3$.

El componente de la preparación de membrana externa

60 Las composiciones de la invención incluyen una preparación de membrana externa de NmB como componente (a). Esta es preferible en forma de vesículas de membrana externa (OMV).

65 Se conoce bien en la técnica la preparación de las OMV de NmB. Se dan a conocer procedimientos para obtener preparaciones adecuadas en, por ejemplo: Claassen y col. [Vaccine (1996) 14: 1001-1008; Cartwright y col. [vaccine (1999) 17:2612-2619]; Peeters y col. [Vaccine (1996) 14: 1009-1015]; Fu y col. [Biotechnology NY 81995) 12: 170-74]; Davies y col. [J. Immunology. Meth. (1990) 134. 215-225]; Saunders y col. [Infect. Immun.

(1999) 67: 113-119], Draabick y col. [Vaccine (2000) 18: 160-172], Moreno y col. [Infect. Immun. (1985) 47: 527-533]; Milagres y col. [Infect. Immun. (1994) 62:4419-4424], Naess y col [Infect. Immun. (1998) 66: 959- 965]; Rosenqvist y col. [Dev. Biol. Stand. (1998) 92: 323-333], Haneberg y col. [Infect. Immun. (1998) 66. 1334-41], Andersen y col. [(1997) 15: 1225-34], Bjune y col. [Lancet (1991) 338: 1093-96] etc.

Las OMV son preferiblemente un extracto de desoxicolato de NmB (es decir, obtenido de NmB mediante extracción del desoxicolato). El protocolo de extracción preferido es el descrito por Fredriksen y col. [Production, characterization and control of MenB vaccine "Forkerhelsa": an outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease (1991) NIPH Ann. 14 (2): 67-80].

Una cepa preferida a partir de la cual se extraen las OMV es la cepa 44/76 (B: 15: P1.7,16. P5.5: 13, 7, 9) de *N. meningitidis*.

Se pueden encontrar detalles adicionales del componente de la OMV en, por ejemplo, Bjune y col. [Lancet (1991) 338 (8775): 1093-96], o Fredriksen y col. [Characterization of high molecular weight component in MenB-vaccine 'Forkerhelsa', an outer group B membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease. Páginas 818-824 de Pathobiology and immunobiology of Neisseriaceae (eds. Conde-Giez y col.) ISBN 968-6502-13-0].

Se puede adsorber el componente de la OMV en adyuvante de hidróxido de aluminio. Una relación proteína:adyuvante preferida es 1:67 (p/p).

Una dosis típica de vacuna para un ser humano contiene 25 µg de proteínas, 2 µg de LPS y 1,67 mg de Al(OH)₃, y se puede inyectar en volúmenes de 0,5 ml en el músculo deltoides.

Se puede tratar el componente de la OMV (por ejemplo, tal como se obtiene mediante la extracción de desoxicolato) para eliminar algunos componentes. Por ejemplo, se pueden eliminar los componentes pirógenos o tóxicos (por ejemplo, LPS).

Se prefiere que el componente de la OMV retenga el componente antigénico de 80 kDa descrito por Fredriksen y col. [páginas 818-824 de Pathobiology and immunobiology of Neisseriaceae].

Más preferiblemente, el componente de la OMV retendrá una proteína que comprende una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEC DE ID 3, SEC DE ID 5, SEC DE ID 7, SEC DE ID 9, SEC DE ID 11, SEC DE ID 13 [o (i) una proteína que tiene una identidad de la secuencia con la SEC DE ID 3, la SEC DE ID 5, la SEC DE ID 7, la SEC DE ID 9, la SEC DE ID 11, o la SEC DE ID 13 - dependiendo de la SEC DE ID concreta, el grado de identidad de la secuencia es preferiblemente mayor del 50 % (por ejemplo, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 99 % o más), que incluye los mutantes y las variantes alélicas, o (ii) una proteína que comprende un fragmento inmunógeno de la SEC DE ID 1, la SEC DE ID 3, la SEC DE ID 5, la SEC DE ID 7, la SEC DE ID 9, la SEC DE ID 11, o la SEC DE ID 13 - el fragmento comprenderá al menos n aminoácidos consecutivos procedentes de la secuencia y, dependiendo de la secuencia concreta, n es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o más)].

Componentes de combinación (a) y (b)

Se pueden combinar los componentes (a) y (b) mediante mezcla simple del componente (b) con una preparación de membrana externa (por ejemplo, mezclando ORF4 con las OMV noruegas).

Como alternativa, se pueden combinar manipulando una bacteria de tal manera que esta produzca (preferiblemente hiperproduzca) el componente (b) en su membrana externa - una preparación de membrana externa de dicha bacteria recombinante comprenderá el componente(a) y el componente (b).

Las bacterias adecuadas para la manipulación de esta manera incluyen *Neisseria meningitidis* (cualquier serogrupo o cepa), *Neisseria lactamica*, *Neisseria cinerea* o cualquier otra *Neisseria* no tipificable. Se pueden usar también otras bacterias Gram negativas, tales como *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Bordetella*, *Yersinia*, *Helicobacter*, etc. Se conocen bien en la técnica los procedimientos de transformación.

Vacunas multivalentes

Opcionalmente, la composición de la invención puede comprender también uno o más de los siguientes componentes:

- un agente protector contra el serogrupo A de *Neisseria meningitidis*;
- un antígeno protector contra el serogrupo C de *Neisseria meningitidis*;
- un antígeno protector contra el serogrupo Y de *Neisseria meningitidis*;

- un antígeno protector contra el serogrupo W de Neisseria meningitidis;
- un antígeno protector contra Haemophilus influenzae;
- un antígeno protector contra pneumococcus;
- un antígeno protector contra la difteria;
- un antígeno protector contra el tétanos;
- un antígeno protector contra la tos ferina;
- un antígeno protector contra Helicobacter pylori;
- un antígeno protector contra la polio; y/o
- un antígeno protector contra el virus de la hepatitis B.

Los ejemplos preferidos de estos componentes opcionales son:

- un antígeno polisacárido contra el serogrupo A de Neisseria meningitidis;
- un antígeno polisacárido contra el serogrupo C de Neisseria meningitidis, tal como el descrito en Costantino y col. (1992) Vaccine 10: 691-698;
- un antígeno polisacárido contra el serogrupo Y de Neisseria meningitidis;
- un antígeno polisacárido contra el serogrupo W de Neisseria meningitidis;
- un antígeno polisacárido contra Haemophilus influenzae;
- un antígeno polisacárido contra pneumococcus;
- un antígeno protector contra la difteria, constituido por un toxoide de la difteria, tal como el mutante CRM197 [por ejemplo, Del Giudice y col. (1998) Molecular Aspects of Medicine 10: 1-70].
- un antígeno protector contra el tétanos, constituido por un toxoide del tétanos [por ejemplo, Wassiliak y Orenstein, Capítulo 4 de Vaccines (eds. Plotkin & Mortimer), 1988]
- un antígeno protector contra la tos ferina, que comprende holotoxina de pertussis (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA); que comprende opcionalmente de manera adicional pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo, Gustafsson y col. (1996) N. Engl. J. med. 334: 349-366; Rappuoli y col. (1991) TIBTECH 9: 232-238].
- un antígeno protector contra H. pylori, que comprende uno o más de CagA (por ejemplo, documento W093718150), VacA (por ejemplo, documento W093/16150), NAP (por ejemplo, documento W099/53310, HopX (por ejemplo documento W098/04702), HopY (por ejemplo, documento W098/04702), ureasa.
- un antígeno protector contra el virus de la hepatitis B, constituido por el antígeno superficial de VHB y/o el antígeno core de VHB.

Cuando la composición comprende un antígeno contra la difteria, éste comprende preferiblemente antígenos contra el tétanos y la polio. Cuando la composición comprende un antígeno contra el tétanos, éste comprende preferiblemente antígenos contra la difteria y la polio. Cuando la composición comprende un antígeno contra la polio, éste comprende preferiblemente antígenos contra la difteria y el tétanos.

La toxina pertussis es una proteína tóxica y, cuando está presente en la composición, está preferiblemente detoxificado. La detoxificación puede ser por medios químicos y/o genéticos. Un mutante detoxificado preferido es el mutante doble 9K/129G [por ejemplo, Rappuoli (1997) Nature Medicine 3: 374-376].

Cuando la composición incluye una proteína que existe en formas nascente y madura diferentes, se usa preferiblemente la forma madura. Por ejemplo, cuando se incluye NspA, (documento W096/29412, véase también Martin y col. (1997) J. Exp. Med 185 1173-1183) se usa preferiblemente la forma madura de la proteína que carece del péptido señal.

Cuando la composición incluye un antígeno polisacárido, el polisacárido se conjuga preferiblemente con una proteína vehículo.

Terapia, profilaxis, diagnóstico

La composición de la invención es preferiblemente una vacuna. Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser tanto profilácticas (es decir, para evitar la infección) como terapéuticas (es decir, para tratar la enfermedad tras la infección).

La invención proporciona también las composiciones de la invención para uso como medicamentos (preferiblemente como vacunas) o como reactivos diagnósticos. Se proporciona también el uso de una composición de acuerdo con la invención en la fabricación de: (i) un medicamento para tratar o evitar la infección debida a las bacterias Neisseriales, (ii) un reactivo diagnóstico para detectar la presencia de bacterias Neisseriales o de anticuerpos aumentados contra las bacterias Neisseriales, y/o (iii) un reactivo que puede aumentar los anticuerpos contra las bacterias Neisseriales. Dichas bacterias Neisseriales pueden ser cualquier especie de cepa (tal como N. gonorrhoeae), pero preferiblemente N. meningitidis, especialmente el serogrupo B (NmB).

También se describe en la presente un procedimiento para tratar un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de acuerdo con la invención. El procedimiento es preferiblemente la inmunización.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

Las secuencias en el listado de secuencias son:

SEC DE ID	DESCRIPCIÓN
1	Secuencia N terminal de la proteína de 80-85 kDa del serogrupo B de <i>N. meningitidis</i>
2	Gen completo del serogrupo B de <i>N. meningitidis</i>
3	Proteína codificada de la SEC DE ID 2
4	Proteína péptido señal de la SEC DE ID 3
5	Proteína madura de la SEC DE ID 3
6	Gen completo de <i>N. gonorrhoeae</i> , homólogo a la SEC DE ID 2
7	Proteína codificada de la SEC DE ID 6
8	Proteína péptido señal de la SEC DE ID 7
9	Proteína madura de la SEC DE ID 7
10	Gen completo del serogrupo A de <i>N. meningitidis</i> , homólogo a la SEC DE ID 2
11	Proteína codificada de la SEC DE ID 10
12	Proteína péptido señal de la SEC DE ID 11
13	Proteína madura de la SEC DE ID 11
14	Proteína '919' de la cepa 2996 de nmb

40 MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

Sigue un resumen de las técnicas y los procedimientos estándares que se pueden emplear con el fin de llevar a cabo la invención (por ejemplo, para utilizar las secuencias dadas a conocer para la vacunación o los objetivos diagnósticos), este resumen no es una limitación de la invención sino, más bien, proporciona ejemplos que se pueden usar, pero no se requieren.

General

La 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 están comprendidas dentro del conocimiento de la persona experta en la técnica. Se explican dichas técnicas completamente en la bibliografía, por ejemplo, Sambrook Molecular Cloning; A Laboratory Manual, segunda edición (1989); DNA Cloning, Volúmenes 1 y 11 (D. N Glover ed. 1985); Oligonucleotides Synthesis (M. J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid 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 Practica! Guide to Molecular Cloning (1984); the Methods in Enzimology series (Academia Press, Inc), especialmente los volúmenes 154 y 155; Gene Transfer Vector for Mammalian Cells (J. H. Millar y M. P. Galos eds. 1987, Cold Spring Harbar Laboratory); Mayer y Walter, eds. (1987), Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academia Press, Londres); Scopes, (1987) Protein Purification; Principies and Practice, Segunda Edición (Springer-Verlag, N. Y.), y Handbook of experimental Immunology, Volúmenes 1-IV (D. M. Weir y C.C. Blackwell eds 1986).

En esta memoria descriptiva se usan abreviaturas estándares para los nucleótidos y los aminoácidos.

Se pueden preparar las proteínas usadas en la invención por diversos medios (por ejemplo, expresión recombinante, purificación a partir de cultivo celular, síntesis química, etc.) y en diversas formas (por

ejemplo, nativa, condensaciones, etc.). Se prepara preferiblemente en forma sustancialmente pura (es decir, sustancialmente libre de otras proteínas de Neisseria o célula huésped).

5 Se puede preparar el ácido nucleico usado en la invención de muchas maneras (por ejemplo, mediante síntesis química, a partir de bibliotecas genómicas o de ADNc, a partir del propio organismo, etc.) y puede tomar diversas formas (por ejemplo, monocatenario, bicatenario, vectores, sondas, etc.). El término "ácido nucleico" incluye ADN y ARN, y también sus análogos, tales como los que contienen esqueletos modificados, y también ácidos nucleicos peptídicos (PNA), etc.

10 Definiciones

15 Una composición que contiene X está "sustancialmente libre de" Y cuando al menos un 85 % en peso del total de X+Y en la composición, es X. Preferiblemente, X comprende al menos aproximadamente un 90 % en peso del total de X+Y en la composición, más preferiblemente al menos aproximadamente un 95 % o incluso un 99 % en peso.

20 El término "que comprende" significa "que incluye" así como "que está constituido", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede estar constituida exclusivamente por X o puede incluir algo adicional a X, tal como X+Y.

25 El término "heterólogo" se refiere a dos componentes biológicos que no se encuentran juntos en la naturaleza. Los componentes pueden ser células huéspedes, genes, o regiones reguladoras, tales como promotores. Aunque los componentes heterólogos no se encuentran juntos en la naturaleza, pueden funcionar conjuntamente, tal como cuando un promotor heterólogo a un gen se une de manera operable al gen. Otro ejemplo es cuando una secuencia Neisserial es heteróloga para una célula huésped de ratón. Ejemplos adicionales serían dos epítopos de las mismas o diferentes proteínas que se han ensamblado en una proteína única en una disposición que no se encuentra en la naturaleza.

30 Un "origen de replicación" es una secuencia de polinucleótidos que inicia y regula la replicación de los polinucleótidos, tal como un vector de expresión. El origen de la replicación comporta una unidad autónoma de replicación de los polinucleótidos en el interior de una célula, capaz de replicación bajo su propio control. Puede ser necesario un origen de replicación para un vector para replicarse en una célula huésped concreta. Con algunos orígenes de replicación, se puede reproducir un vector de expresión en un número elevado de copias en presencia de las proteínas apropiadas en el interior de la célula. Ejemplos de orígenes son las secuencias que se replican autónomamente, que son efectivas en levaduras, y el antígeno T vírico efectivo en células COS-7

35 Se determina preferiblemente la identidad entre proteínas mediante el algoritmo de búsqueda de la homología de Smith-Waterman que se implementa en el programa MPSRCH (Oxford Molecular), usando una búsqueda de hueco afín con parámetros de penalización por apertura de hueco = 12 y penalización por extensión de hueco = 1. Normalmente, se considera una identidad del 50% o más entre dos proteínas como una indicación de equivalencia funcional.

40 Tal como se usa en el presente documento, una "variante alélica" de una molécula de ácido nucleico, o región, para la cual se proporciona la molécula de ácido nucleico, o región, que se produce esencialmente en el mismo locus en el genoma de otro o segundo aislado, y que, debido a la variación natural producida por, por ejemplo, mutación o recombinación, tiene una secuencia de ácido nucleico similar, pero no idéntica. Una variante alélica de la región de codificación codifica normalmente una proteína que tiene actividad similar a la de la proteína codificada por el gen a la cual se está comparando. Una variante alélica puede comprender también una alteración en las regiones 5' o 3' no traducidas del gen, tales como en las regiones reguladoras de control (por ejemplo, véase la patente de los Estados Unidos 5.753.235).

45 Sistemas de expresión

50 Se pueden expresar las secuencias de nucleótidos neisseriales en una variedad de diferentes sistemas de expresión; por ejemplo, los usados con células de mamíferos, baculovirus, plantas, bacterias, y levaduras.

55 i. Sistemas de mamíferos

60 Se conocen en la técnica los sistemas de expresión de mamíferos. Un promotor de mamífero es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa de mamífero e iniciar la transcripción en la dirección 3' (3') de una secuencia de codificación (por ejemplo, gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción, que se sitúa normalmente próxima al extremo 5' de la secuencia de codificación, y una secuencia TATA, localizada normalmente 25-30 pares de bases (pb) en la dirección 5' del lugar de inicio de la transcripción. Se piensa que la secuencia TATA dirige la ARN polimerasa 11 para iniciar la síntesis de ARN en el lugar correcto. Un promotor de mamífero contendrá también un elemento promotor en la dirección 5',

localizado normalmente en el interior de los 100 a 200 pb en la dirección 5' de la secuencia TATA. Un elemento promotor en la dirección 5' 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". En *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed.].

5 Los genes víricos de mamíferos están a menudo muy expresados y tienen una amplia gama de huéspedes, por tanto, las secuencias que codifican genes víricos de mamíferos proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Los ejemplos incluyen el promotor temprano de Sv40, el promotor LTR del virus del tumor mamario de ratón, el promotor tardío mayor de adenovirus (Ad MLP), y el promotor del virus del herpes simple. Adicionalmente, las secuencias derivadas de genes no víricos, tal como el gen de la metaloteioneína de murino, proporcionan también secuencias promotoras útiles. La expresión puede ser tanto constitutiva como regulada (inducible), dependiendo de que se pueda inducir el promotor con glucocorticoide en células sensibles a hormonas.

15 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 lugar de inicio normal del ARN. Los potenciadores son también activos cuando se sitúan en la dirección 5' o en la dirección 3' del lugar de inicio de la transcripción, tanto en orientación normal como girada, o a una distancia de más de 1000 nucleótidos del 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 tienen usualmente una gama más amplia de huéspedes. Los ejemplos incluyen el potenciador del gen temprano de SV40 [Dijkerna y col (1985) *EMBO J.* 4: 761] y los potenciadores/promotores derivados de la repetición terminal larga (LTR) del virus del Sarcoma de Rous [Gorman y col. (1982b) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 6777] y de citomegalovirus humanos [Boshart y col. (1985) *Cell* 41 :521]. Adicionalmente, algunos potenciadores son regulables y llegan a ser activos únicamente 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].

30 Se puede expresar una molécula de ADN intracelularmente en células de mamíferos. Se puede unir directamente una secuencia promotora con la molécula de ADN, en cuyo caso, el primer aminoácido en el término N de la proteína recombinante será siempre una metionina, que está codificada por el codón de inicio ATG. Si se desea, se puede escindir el término N de la proteína mediante incubación in Vitro con bromuro de cianógeno.

35 Alternativamente, se pueden secretar proteínas extrañas a partir de la célula en los medios de crecimiento creando moléculas de ADN químicas que codifican una proteína de condensación comprendida por un fragmento de la secuencia líder que proporciona la secreción de la proteína extraña en las células de mamíferos. Preferiblemente, existen lugares de procesamiento codificados entre el fragmento líder y el gen extraño que se pueden escindir tanto in vivo como in vitro. El fragmento de la secuencia líder codifica normalmente un péptido señal comprendido por aminoácidos hidrófobos que dirigen la secreción de la proteína a partir de la célula. El adenovirus tripartido líder es un ejemplo de una secuencia líder que proporciona la secreción de una proteína extraña en células de mamíferos.

45 Normalmente, las secuencias de terminación de la transcripción y de poliadenilación reconocidas por las células de mamíferos son regiones reguladoras localizadas 3' respecto del codón de detención de la traducción y de esta manera, junto con los elementos promotores, flanquean la secuencia de codificación. El término 3' de ARNm maduro está formado por la escisión post-traducciona específica del lugar y la 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 se puede traducir en el polipéptido codificado por el ADN. Los ejemplos de señales del finalizador de la transcripción/poliadenilación incluyen lo derivados de SV40 [sambrook y col (1989) "Expression of cloned genes in cultures mammalian celis". En *molecular cloning: A Laboratory Manual*.

55 Normalmente, los componentes anteriormente descritos, que comprenden un promotor, una señal de poliadenilación, y una secuencia de finalización de la transcripción se introducen juntos en construcciones de expresión. Se pueden incluir también potenciadores, intrones con lugares donante y aceptar de corte y empalme, y las secuencias líder en una construcción de expresión, si se desea. Las construcciones de expresión se mantienen a menudo en un replicón, tal como un elemento extracromosómico (por ejemplo, plásmidos) capaz de mantenimiento estable en un huésped, tal como células de mamíferos o bacterias. Los sistemas de replicación en mamíferos incluyen los derivados de virus animales, que requieren factores actuantes in trans para replicarse. Por ejemplo, los plásmidos que contienen sistemas de replicación de papovavirus, tales como SV40 [Giuzman (1981) *Cell* 23: 175] o poliomavirus, se replican en un número extremadamente elevado de copias en presencia del antígeno T vírico apropiado. Los ejemplos adicionales de replicones de mamíferos incluyen los derivados de papilomavirus bovinos y virus de Epstein-Barr. Adicionalmente, el replicón puede tener dos sistemas de replicación, permitiendo de esta manera que se mantenga, por ejemplo, en células de mamíferos para la expresión y en un

huésped procariota por la clonación y la amplificación. Los ejemplos de dichos vectores lanzadera de bacterias de mamíferos incluyen pMT2 [Kaufman y col. 81989] Mol. Cell. Biol. 9:946] y pHEBO [Shimizu y col. (1986) Mol. Cell. Biol. 6: 1074].

5 El procedimiento de transformación usado depende del huésped que se va a transformar. Se conocen en la técnica los procedimientos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamíferos, e incluyen la transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada con polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del polinucleótido(s) en liposomas, y microinyección directa del ADN en núcleos.

10 Se conocen en la técnica líneas de células de mamíferos disponibles como huéspedes para la expresión, e incluyen muchas líneas de células inmortalizadas disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC), que incluyen, pero no se limitan a, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), y otras numerosas líneas celulares.

15 ii. Sistemas de baculovirus

20 También se puede insertar el polinucleótido que codifica la proteína en un vector de expresión de insecto adecuado, y se une de manera operable a los elementos de control en el interior de este vector. La construcción del vector emplea técnicas que se conocen en la técnica. Generalmente, los componentes del sistema de expresión incluyen un vector de transferencia, usualmente un plásmido bacteriano, que contiene un fragmento del genoma de baculovirus, y un lugar de restricción conveniente para la inserción del gen o los genes heterólogos que se van a expresar, un baculovirus natural con una secuencia homóloga a la del fragmento específico de baculovirus en el vector de transferencia (esto permite la recombinación homóloga del gen heterólogo en el genoma del baculovirus); y células huéspedes de insectos apropiadas y medios de crecimiento.

25 Tras insertar la secuencia de ADN que codifica la proteína en el vector de transferencia, el vector y el genoma vírico natural se transfectan en una célula huésped de insecto, en la que se permite que se recombinen el vector y el genoma vírico. El virus recombinante empaquetado se expresa y se identifican y se purifican las placas recombinantes. Están comercialmente disponibles en forma de kit los materiales y los procedimientos de los sistemas de expresión de baculovirus/célula de insecto de, entre otros, Invitrogen, San Diego CA (kit "MaxBac". Las personas expertas en la técnica conocen generalmente estas técnicas y se describen completamente en Summers y Smith, en el Boletín nº 1555 de la Texas Agricultural Experiment Station (1987) (a partir de ahora en el presente documento "Summers y Smith").

30 Antes de insertar la secuencia de ADN que codifica la proteína en el genoma del baculovirus, los componentes anteriormente descritos se ensamblan usualmente en una construcción intermedia colocada en trans (vector de transferencia). Esta construcción puede contener un gen único y los elementos reguladores unidos de manera operable; múltiples genes, cada uno con su propio conjunto de elementos reguladores unidos de manera operable, o múltiples genes, regulados por el mismo conjunto de elementos reguladores. Las construcciones intermedias colocadas en trans se mantienen a menudo en un replicón, tal como un elemento extracromosómico (por ejemplo, plásmidos) capaz de mantenimiento estable en un huésped, tal como una bacteria. El replicón tendrá un sistema de replicación, permitiendo de esta manera que se mantenga en un huésped adecuado para la clonación y la amplificación.

35 Actualmente, el vector de transferencia más comúnmente usado para introducir genes extraños en AcNPV es pAc373. Se han diseñado también otros muchos vectores, conocidos por las personas expertas en la técnica. Estos incluyen, por ejemplo, pVL985 (que altera el codón de inicio de la polihedrina de ATG a ATT, y que introduce un lugar de clonación BamHI de 32 pares de bases en la dirección 3' a partir de ATT; véase Luckow y Summers, Virology (1989) 17. 31.

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

45 Los vectores de transferencia de baculovirus contienen normalmente un promotor de baculovirus. Un promotor de baculovirus es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse a una ARN polimerasa de baculovirus y de iniciar la transcripción en la dirección 3' (5' a 3') de una secuencia de codificación (por ejemplo, gen estructural) en el ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción que se coloca normalmente próxima al extremo 5' de la secuencia de codificación. Esta región de inicio de la transcripción incluye normalmente un lugar de unión a la ARN polimerasa y un lugar de inicio de la transcripción. Un vector de transferencia de baculovirus puede tener también una segunda región denominada potenciador, que, si está presente, es normalmente distal al gen estructural. La expresión puede ser tanto regulada como constitutiva.

50

Los genes estructurales, abundantemente transcritos en los últimos estadios en un ciclo de infección vírica, proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Los ejemplos incluyen las secuencias derivadas del gen que codifica la proteína vírica de la polihedrina, Friesen y col., (1986) "The regulation of Baculovirus Gene Expresión", en: *The Molecular Biology of Baculoviruses* (ed. Walter Doerfler); Publ. EPO Nos 127 839 y 155 476, y el gen que codifica la proteína p10, Vlak y col., (1988), *J. Gen. Viral.* 69. 765.

Se puede derivar el ADN que codifica las secuencias señal adecuadas, a partir de los genes de las proteínas segregadas por insectos o baculovirus, tales como el gen de la polihedrina de baculovirus (Carbonell y col. (1988) *Gene*, 73: 409). Alternativamente, debido a que las señales por las modificaciones postraduccionales de las células de mamíferos (tales como la escisión del péptido señal, escisión proteolítica, y fosforilación) parecen ser reconocidas por las células de insectos, y las señales requeridas para la secreción y la acumulación nuclear parecen también conservarse entre las células de invertebrados y las células de vertebrados, líderes de origen no de insecto, tales como los derivados de los genes que codifican el interferón a humano, Maeda y col., (1985), *Nature* 315: 592; se puede usar también el péptido que libera la gastrina humana, Lebacqz-Verheyden y col., (1988), *Malee. 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 la glucocerebrosidasa humana, Martin y col. (1988) *DNA*, 7: 99, para proporcionar la secreción en insectos.

Se puede expresar intracelularmente un polipéptido o poliproteína recombinante o, si se puede expresar éste con las secuencias reguladoras apropiadas, se puede segregar. Una buena expresión intracelular de las proteínas extrañas no condensadas requiere normalmente genes heterólogos que tienen idealmente una secuencia líder corta que contiene las señales de inicio de la traducción adecuadas que preceden a una señal de inicio de ATG. Si se desea, se puede escindir la metionina en el término N a partir de la proteína madura mediante incubación in vitro con bromuro de cianógeno.

Alternativamente, se pueden segregar poliproteínas o proteínas recombinantes que no se segregan naturalmente de la célula de insecto creando moléculas de ADN quiméricas que codifican una proteína de condensación comprendida por un fragmento de secuencia líder que proporciona la secreción de la proteína extraña en insectos. El fragmento de secuencia líder codifica normalmente un péptido señal comprendido por aminoácidos hidrófobos que dirigen la translocación de la proteína en el retículo endoplásmico.

Tras la inserción de la secuencia de ADN y/o del gen que codifica el producto de expresión precursor de la proteína, una célula huésped de insecto se transforma simultáneamente con el ADN heterólogo del vector de transferencia y el ADN genómico del baculovirus natural - usualmente mediante transfección simultánea. El promotor y la secuencia de finalización de la transcripción de la construcción comprenderán normalmente una sección de 2-5 kb del genoma del baculovirus. Se conocen en la técnica procedimientos para introducir ADN heterólogo en el lugar deseado del baculovirus. (Véanse Summers y Smith, más arriba, Ju y col. (1987); Smith y col., *Mol. Cell. Biol.* (1983) 3: 2156, y Luckow y Summers (1989)). Por ejemplo, la inserción puede ser en un gen tal como el gen de la polihedrina, mediante recombinación homóloga con doble entrecruzamiento; la inserción puede ser también en un lugar del enzima de restricción construido mediante ingeniería genética en el gen de baculovirus deseado. Miller y col., (1989), *Bioassays* 4: 91. La secuencia de ADN, cuando se clona en lugar del gen de la polihedrina en el vector de expresión, está flanqueada por las secuencias específicas de la polihedrina en 5' y 3' y se sitúa en la dirección 3' del promotor de la polihedrina.

El vector de expresión de baculovirus recientemente formado se empaqueta posteriormente en un baculovirus recombinante infeccioso. Se produce la recombinación homóloga a baja frecuencia (entre aproximadamente 1 % y aproximadamente 5 %); de esta manera, la mayoría del virus producido tras la transfección simultánea es todavía virus natural. Por tanto, es necesario un procedimiento para infectar los virus recombinantes. Una ventaja del sistema de expresión es un cribado visual que permite distinguir a los virus recombinantes. La proteína polihedrina, que se produce por 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 contienen también partículas incluidas. Estos cuerpos de oclusión, de hasta 15 μ m de tamaño, son muy retráctiles, proporcionándoles una apariencia brillante que se visualiza fácilmente con el microscopio óptico. Las células infectadas con virus recombinantes carecen de cuerpos de oclusión. Para distinguir el virus recombinante del virus natural, se plaquea el sobrenadante de la transfección sobre una monocapa de células de insecto mediante técnicas conocidas por las personas expertas en la materia. Concretamente, se criban las placas bajo el microscopio óptico para la presencia (indicativa del virus natural) o ausencia (indicativa de virus recombinante) de cuerpos de oclusión. "Current Protocols in Microbiology" Vol. 2 (Ausebel y col. Eds) a 16,8 (Supp. 10, 1990); Summers y Smith, más arriba; Millar y col. (1989).

Se han desarrollado vectores de expresión de baculovirus recombinante par la infección en diversas células de insectos. Por ejemplo, se han desarrollado baculovirus recombinantes para, entre otros: *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda*, y *Trichoplusia ni* (documento W089/046699; 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).

Las células y los medios de cultivo están comercialmente disponibles para la expresión directa y de condensación de los polipéptidos heterólogos en un sistema de expresión de baculovirus; las personas expertas en la técnica conocen generalmente la tecnología del cultivo celular. Véase, por ejemplo, Summers y Smith, más arriba.

Se pueden hacer crecer a continuación las células de insectos modificadas en un medio nutriente apropiado, que permita el mantenimiento estable del plásmido(s) presente en el huésped de insecto modificado. Cuando el producto de expresión del gen está bajo control inducible, se puede hacer crecer el huésped a una elevada densidad, e inducirse la expresión. Alternativamente, cuando la expresión es constitutiva, el producto se expresará continuamente en el medio y debe hacerse circular el medio nutriente continuamente, retirando a la vez el producto de interés y aumentando los nutrientes agotados. Se puede purificar el producto mediante dichas técnicas tales como cromatografía, por ejemplo, HPLC, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, etc; electroforesis, centrifugación en gradiente de densidad; extracción con disolvente, o similares. Según se apropiado, se puede purificar el producto adicionalmente, según se requiera, de tal manera que se elimine sustancialmente cualquier proteína de insecto que se segrega también en el medio o como resultado de la lisis de las células de insectos, de tal manera que se proporcione un producto que esté al menos sustancialmente libre de desechos del huésped, por ejemplo, proteínas, lípidos y polisacáridos.

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 que codifica la proteína recombinante. Estas condiciones variarán, dependiendo de la célula huésped seleccionada. Sin embargo, las condiciones son fácilmente verificables para las personas normalmente expertas en la técnica, basándose en lo que se conoce en la técnica.

iii. Sistemas de plantas

Existen muchos cultivos celulares de plantas y sistemas de expresión genética de plantas completas conocidos en la técnica. Los sistemas de expresión genética celular de plantas a modo de ejemplo incluyen los descritos en patentes, tales como: US 5.693.506; US 5.659.122, y US 5.608.143. Se han descrito ejemplos adicionales de expresión genética en cultivos celulares de plantas por Zenk, *Phytochemistry* 30: 3861-3863 (1991). Se pueden encontrar péptidos señal de proteínas de plantas adicionalmente a las referencias descritas anteriormente en Vaulcombe 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). Se puede encontrar una descripción de la regulación de la expresión génica en plantas por la fitohormona, el ácido giberélico y las enzimas segregadas inducidas por el ácido giberélico en R. L. Jones y J. MacMillin, *Gibberellins: en. Advanced Plant Physiology.*, Malcom B. Wilkins, ed., 1984 Pitman Publishing Limited, Londres, pp. 21-52. Referencias que describen otros genes regulados metabólicamente: Sheen, *Plant Cell*, 2: 1027-1038 (1990); Maas y col., *EMBO J.* 9: 3447-3452 (1990); Benkel y Hickey, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 1337-1339 (1987).

Normalmente, usando técnicas conocidas en la materia, se inserta una secuencia de polinucleótidos deseada en un casete de expresión que comprende los elementos reguladores genéticos diseñado para la operación en plantas. Se inserta el casete de expresión en un vector de expresión deseado con secuencias de acompañamiento en la dirección 5' y en la dirección 3' del casete de expresión adecuado para la expresión en una planta huésped. Las secuencias de acompañamiento serán de plásmido o de origen vírico y proporcionan las características necesarias para que el vector permita a los vectores movilizar el ADN desde un huésped de clonación original, tal como una bacteria, a la planta huésped deseada. La construcción del vector bacteriano/planta básico proporcionará preferiblemente una amplia gama de huéspedes de origen de replicación procariota, un marcador seleccionable procariota, y, para las transformaciones de *Agrobacterium*, las secuencias de ADN T para la transferencia mediada por *Agrobacterium* en los cromosomas de la planta. Cuando el gen heterólogo no es completamente adecuado para la detección, la construcción tendrá preferiblemente un gen marcador seleccionable adecuado para determinar si se ha transformado una célula de planta. Se encuentra una revisión general de marcadores adecuados, por ejemplo, de los miembros de la familia de las hierbas, en Wilmink y Dons, 1993, *Plant Mol. Biol. Repr.*, 11 82): 165-185.

Se recomiendan también secuencias adecuadas para permitir la integración de la secuencia heteróloga en el genoma de la planta. Estas pueden incluir secuencias del transposón y similares para la recombinación homóloga así como secuencias Ti que permiten la inserción aleatoria de un casete de expresión heteróloga en un genoma de la planta. Los marcadores seleccionables procariotas adecuados incluyen resistencia hacia los antibióticos tales como ampicilina o tetraciclina. Pueden estar también presentes en el vector otras secuencias de ADN que codifican funciones adicionales, como se conoce en la técnica.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención sujeto pueden estar incluidas en un casete de expresión para la expresión de la proteína(s) de interés. Normalmente, será únicamente un casete de expresión,

5 aunque son factibles dos o más. El casete de expresión recombinante contendrá además de la secuencia de codificación de la proteína heteróloga, los siguientes elementos, una región promotora, secuencias 5' no traducidas de la planta, el codón de inicio dependiendo de si el gen estructural o no viene equipado con una, y la secuencia de transcripción y de finalización de la traducción. Los lugares únicos del enzima de transcripción en los extremos 5' y 3' del casete permiten la fácil inserción en un vector preexistente.

10 Una secuencia de codificación heteróloga puede ser para cualquier proteína relacionada con la presente invención. La secuencia que codifica la proteína de interés codificará un péptido señal que permite el procesamiento y la translocación de 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 con una membrana. Debido a esto, para la mayor parte, la región de inicio de la transcripción será para un gen que se expresa y transloca durante la germinación, empleando el péptido señal que se proporciona para la translocación, se puede proporcionar también para la translocación de la proteína de interés. De esta manera, la proteína(s) de interés se translocará desde las células en las que se expresa y se puede cosechar eficazmente. Normalmente, la secreción en las semillas es a través de la aleurona o la capa de epitelio escutelar en el endospermo de la semilla. Aunque no se requiere que la proteína se segregue a partir de las células en las que se produce la proteína, esto facilita el aislamiento y la purificación de la proteína recombinante.

20 Debido a que la expresión última del producto génico deseado será en una célula eucariota, es deseable determinar si cualquier porción del gen clonado contiene las secuencias que se procesarán como intrones por la maquinaria del huésped, si acaso, se puede llevar a cabo la mutagénesis dirigida al emplazamiento de la región del "intrón" para evitar la pérdida de una porción del mensaje genético como un código de intrón falso. Reed y Maniatis, Cell 41. 95-105, 1985.

25 El vector se puede microinyectar directamente en células de plantas mediante el uso de micropipetas para transferir mecánicamente el ADN recombinante. Crossway, Mol. Gen. Genet, 202: 179-185, 1985. Se puede transferir también el material genético en 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 elevada velocidad de penetración balística por las partículas pequeñas con el ácido nucleico tanto en el interior de la matriz de perlas o partículas pequeñas, o sobre la superficie, Klein, y col., Nature, 327, 70-73, 1987 y Knudsen y Muller, 1991, Planta, 185: 330-336 que enseña el bombardeo de partículas de endosperma de cebada para crear cebada transgénica. Otro procedimiento más de introducción sería la fusión de protoplastos con otras entidades, tanto minicélulas, células, lisosomas, como otros cuerpos fusibles superficiales pulidos, Fraley, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1859-1863, 1982.

35 Se puede introducir también el vector en las células de las plantas mediante electroporación. (Fromm y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5824, 1985). En esta técnica, se electroporan los protoplastos de la planta en presencia de plásmidos que contiene la construcción génica. Los impulsos eléctricos de fuerza de campo alto permeabilizan reversiblemente las biomembranas permitiendo la introducción de los plásmidos. Los protoplastos de las plantas electroporadas reforman la pared celular, la dividen, y forman el callo de la planta.

40 Todas las plantas de las que se pueden aislar y cultivar protoplastos para dar plantas regeneradas completas, se pueden transformar mediante la presente invención de tal manera que se recuperan plantas completas que contienen el gen transferido. Se sabe que prácticamente se pueden regenerar todas las plantas a partir de células o tejidos cultivados, incluyendo, pero sin limitarse a todas las especies principales de caña de azúcar, azúcar de remolacha, algodón, frutales y otros árboles, legumbres y vegetales. Algunas plantas adecuadas incluyen, por ejemplo, especies de los géneros Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonalla, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solanum, Petunia, Digitalis, Majorana, Chicorium, Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Hererocallis, Nemesis, Pelargonium, Panicum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browaalia, Glycine, Lolium, Zea, Triticum, Sorghum, y Datura.

45 Los medios para la regeneración varían de especie a especie de plantas, pero generalmente, se proporciona en primer lugar una suspensión de protoplastos transformados que contienen copias del gen heterólogo. Se forma el tejido del callo y se pueden inducir los brotes a partir del callo y posteriormente enraizarse. Alternativamente, se puede inducir la formación del embrión a partir de la suspensión de protoplastos. Estos embriones germinan como embriones naturales para formar plantas. Los medios de cultivo contendrán generalmente algunos aminoácidos y hormonas, tales como auxina y citocinas. Es también ventajoso añadir ácido glutámico y prolina al medio, especialmente para las mencionadas especies como maíz y alfalfa. Los brotes y las raíces se desarrollan normalmente de manera simultánea. La regeneración eficaz dependerá del medio, del genotipo y del historial del cultivo. si se controlan estas tres variables, entonces la regeneración es completamente reproducible y repetible.

60 En algunos sistemas de cultivo de células de plantas, se puede excretar la proteína deseada de la invención o alternativamente, se puede extraer la proteína de la planta completa. Cuando se segrega la proteína

deseada de la invención en el medio, se puede recoger. Alternativamente, embriones y las semillas autoembrionadas u otros tejidos de la planta se pueden perturbar mecánicamente para liberar cualquier proteína segregada entre las células y los tejidos. Se puede suspender la mezcla en una disolución tampón para recuperar las proteínas solubles. Se usarán procedimientos de aislamiento y purificación de las proteínas convencionales para purificar la proteína recombinante. Se ajustarán los parámetros de tiempo, temperatura, pH, oxígeno y los volúmenes mediante procedimientos rutinarios para optimizar la expresión y recuperar la proteína heteróloga.

iv. Sistemas bacterianos

Se conocen en la técnica, técnicas de expresión bacteriana. Un promotor bacteriano es cualquier secuencia de ADN capaz de unir la ARN polimerasa bacteriana y de iniciar la transcripción en la dirección 3' (3') de la secuencia de codificación (por ejemplo, gen estructural) en el ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción que se coloca normalmente próxima al extremo 5' de la secuencia de codificación. Esta región de inicio de la transcripción incluye normalmente un lugar de unión a la ARN polimerasa y un lugar de inicio de la transcripción. Un promotor bacteriano puede tener también una segunda región denominada operador que puede solapar un lugar de unión a la ARN polimerasa adyacente en el cual comienza la síntesis de ARN. El operador permite una transcripción regulada negativa (inducible), ya que la proteína represora puede unirse al operador e inhibir por tanto la transcripción de un gen específico. Se puede producir la expresión constitutiva en ausencia de elementos reguladores negativos, tales como el operador. Adicionalmente, se puede conseguir la regulación positiva mediante una secuencia de unión a la proteína activadora del gen, que, si está presente, está normalmente próxima (5') a la secuencia de unión a la ARN polimerasa. Un ejemplo de proteína activadora del gen es la proteína activadora del catabolito (CAP) que ayuda a iniciar la transcripción del operón lacen *Escherichia coli* (*E. coli*) [Raibaud y col. (1984) *Annu. Rev. Genet.* 18: 173]. La expresión regulada puede por tanto ser tanto positiva como negativa, potenciando o reduciendo por tanto la transcripción.

Las secuencias que codifican los enzimas de la ruta metabólica proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Los ejemplos incluyen secuencias promotoras derivadas de enzimas que metabolizan azúcares, tales como galactosa, lactosa (lac) [Chang y col. (1977) *Nature* 198: 1056], y maltosa. Los ejemplos adicionales incluyen secuencias promotoras derivadas de enzimas biosintéticos tales como triptófano (trp) [Goeddel y col. (1980) *Nucl. Acids. Res.* 8: 4057, Yelverton y col. (1981) *Nucl. Acids Res.* 9: 731; patente de los Estados Unidos 4.738.921; documento EP-A-0036776 y documento EP-A-01217754]. El sistema promotor de la β -lactamasa (b/a) [Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes". En *Interferon 3* (ed. I. Gresser)], los sistemas promotores del bacteriófago lambda PL [Shimatake y col. (1981) *Nature* 292: 128] y T5 [patente de los estados Unidos 4.689.406] proporcionan también secuencias promotoras útiles.

Adicionalmente, los promotores sintéticos que no se producen en la naturaleza, funcionan también como promotores bacterianos. Por ejemplo, las secuencias de activación de la transcripción de un promotor bacteriano o bacteriófago se pueden unir con las secuencia del operón de otro promotor bacteriano o bacteriófago, creando un promotor híbrido sintético [patente de los Estados Unidos 4.551.433]. Por ejemplo, el promotor tac es un promotor híbrido trp-lac comprendido por las secuencia del promotor trp y del operón lac que están reguladas por el represor lac [Amann y col. (1983) *Gene* 25: 167, de Boer y col. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 20 21]. Además, un promotor bacteriano puede incluir promotores de origen no bacteriano que se producen naturalmente que tienen la capacidad de unirse a la ARN polimerasa bacteriana y de iniciar la transcripción. Un promotor de origen no bacteriano que se produce naturalmente se puede acoplar también con una ARN polimerasa compatible para producir elevados niveles de expresión de algunos genes en procariontas. El sistema de ARN polimerasa/promotor del bacteriófago T7 es un ejemplo de un sistema promotor acoplado [Studier y col. (1996) *J. Mol. Biol.* 189: 113, Tabor y col. (1985) *Proc Natl. Acad. Sci.* 82: 1074]. Adicionalmente, puede estar comprendido un promotor híbrido de un promotor de bacteriófago y una región operadora de *E. coli* (documento EPO-A-O 267 851).

Adicionalmente al funcionamiento de la secuencia promotora, un lugar de unión al ribosoma eficaz es también útil para la expresión de genes extraños en procarionta. En *E. coli*, el lugar de unión al ribosoma se denomina secuencia de Shine-Dalgarno (SD) e incluye un codón de inicio (ATG) y una secuencia de 3-9 nucleótidos de longitud localizada 3-11 nucleótidos en la dirección 5' del codón de inicio [Shine y col. (1975) *Nature* 254: 34]. Se piensa que la secuencia SD promueve la unión del ARNm al ribosoma mediante el emparejamiento de bases entre la secuencia SD y 3' y el ARNr de 16S de *E. coli* [Steitz y col. (1979) "Genetic signals and nucleotide sequences in Messenger RNA". En *Biological Regulation and Development: Gene expresión* (ed. R. F. Goldberger)]. Para expresar genes eucariotas y genes procariontas con un lugar de unión al ribosoma débil [Sambrook y col. (1989) "Expresión of cloned genes in *Escherichia coli*". En *Molecular Cloning: A laboratory Manual*].

Se puede expresar una molécula de ADN intracelularmente. Se puede unir directamente una secuencia promotora con la molécula de ADN, en cuyo caso el primer aminoácido en el término N será siempre una metionina, que está codificada por el codón de inicio ATG. Si se desea, se puede escindir la metionina en el término N de la proteína mediante incubación *in vitro* con bromuro de cianógeno o mediante incubación, tanto *in vivo* como *in vitro* con una peptidasa N terminal de la metionina bacteriana (documento EPO-A-0-219 237).

Las proteínas de condensación proporcionan una alternativa a la expresión directa. Normalmente, una secuencia de ADN que codifica la porción N terminal de una proteína bacteriana endógena, u otra proteína estable, se condensa en el extremo 5' de las secuencias de codificación heterólogas. Tras la expresión, esta construcción proporcionará una condensación de las dos secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, se puede unir el gen celular del bacteriófago lambda en el término 5' de un gen extraño y expresarse en la bacteria. La proteína de condensación resultante retiene preferiblemente un lugar para la enzima de procesamiento (factor Xa) para escindir la proteína del bacteriófago procedente del gen extraño [Nagai y col. (1984) Nature 309: 810]. Se pueden preparar también proteínas de condensación con secuencias procedentes de /acZ[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 los genes Chey [documento EP-A-O 324 647]. La secuencia de ADN en la unión de las dos secuencias de aminoácidos puede codificar o no un lugar escindible. Otro ejemplo es la proteína de condensación ubiquitina. Dicha proteína de condensación se prepara con la región de la ubiquitina que retiene preferiblemente un lugar para un enzima de procesamiento (por ejemplo, la proteasa de procesamiento específica de ubiquitina) para escindir la ubiquitina procedente de la proteína extraña. Mediante este procedimiento, se puede aislar la proteína extraña natural [Miller y col. (1989) Bio/Technology 7: 698].

Alternativamente, se pueden segregar también las proteínas extrañas a partir de la célula creando moléculas de ADN quimérico que codifican una proteína de condensación comprendida por un fragmento de la secuencia del péptido señal que proporciona la secreción de la proteína extraña en bacterias [patente de los Estados Unidos 4.336.336]. El fragmento de la secuencia señal codifica normalmente un péptido señal comprendido por aminoácidos hidrófobos que dirige la secreción de la proteína a partir de la célula. La proteína se segrega tanto en los medios de crecimiento (bacterias gram positivas) como en el espacio periplásmico, localizado entre la membrana interna y externa de la célula (bacterias gram negativas). Existen preferiblemente lugares de procesamiento, que se pueden escindir tanto in vivo como in vitro codificados entre el fragmento del péptido señal y el gen extraño.

Se puede derivar el ADN que codifica las secuencias señal adecuadas a partir de genes para las proteínas bacterianas segregadas, tal 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. 81985] Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 7212]. Como ejemplo adicional, se puede usar la secuencia señal del gen de la alfa-amilasa de diversas cepas de Bacillus para segregar las proteínas heterólogas de B. subtilis [Palva y col. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 5582; documento EP-A-O 244 042].

Normalmente, las secuencias de finalización de la transcripción reconocidas por las bacterias son regiones reguladoras localizadas 3' al codón de detención de la traducción, y de esta manera, junto con el promotor, flanquean la secuencia de codificación. Estas secuencias dirigen la transcripción de un ARNm que se puede traducir en el polipéptido codificado por el ADN. Las secuencias de finalización de la transcripción incluyen frecuentemente las secuencias de ADN de aproximadamente 50 nucleótidos capaces de formar estructuras de lazo con vástago que ayudan a finalizar la transcripción. Los ejemplos incluyen las secuencias de finalización de la transcripción derivadas de genes con promotores fuertes, tales como el gen trp en E. coli, así como otros genes biosintéticos.

Normalmente, los componentes anteriormente descritos, que comprenden un promotor, una secuencia señal (si se desea), la secuencia de codificación de interés, y la secuencia de finalización de la transcripción, se introducen juntos en construcciones de expresión. Las construcciones de expresión se mantienen a menudo en un replicón, tal como un elemento extracromosómico (por ejemplo, plásmidos) capaz de mantenimiento estable en un huésped, tal como bacterias. El replicón tendrá un sistema de replicación, permitiéndole de esta manera mantenerse en un huésped procarionta tanto para la expresión como para la clonación y la amplificación. Adicionalmente, un replicón puede ser un plásmido con un número elevado o bajo de copias: Un plásmido con un número elevado de copias tendrá generalmente un número de copias que oscila entre aproximadamente 5 y aproximadamente 200, y normalmente aproximadamente 10 a aproximadamente 150. Un huésped de un plásmido que contiene un elevado número de copias contendrá preferiblemente al menos aproximadamente 10, y más preferiblemente al menos aproximadamente 20 plásmidos. Se puede seleccionar un vector con un número elevado o bajo de copias, dependiendo del efecto del vector y de la proteína extraña del huésped.

Alternativamente, se pueden integrar las construcciones de expresión en el genoma bacteriano con un vector de integración. Los vectores de integración contienen normalmente al menos una secuencia homóloga con el cromosoma bacteriano que permite integrarse al 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 construidos con ADN de diversas cepas de Bacillus se integran en el cromosoma de Bacillus (documento EP-A-O 127328). Los vectores de integración pueden también estar comprendidos por secuencias del bacteriófago o del transposón.

Normalmente, las construcciones de expresión extracromosómicas y de integración pueden contener marcadores seleccionables que permiten la selección de cepas bacterianas que se han transformado. Se pueden expresar marcadores seleccionables en el huésped bacteriano y pueden incluir genes que vuelven las bacterias

resistentes a los fármacos tales como ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, kanamicina (neomicina), y tetraciclina [Davies y col. (1978) Annu. Rev. Microbiol. 32: 469]. Los marcadores seleccionables pueden incluir también genes biosintéticos, tales como los de las rutas biosintéticas de la histidina, triptófano, y leucina.

5 Alternativamente, algunos de los componentes anteriormente descritos se pueden introducir juntos en vectores de transformación. Los vectores de transformación están comprendidos normalmente por un marcador seleccionable que se mantiene tanto en un replicón como se desarrolla en un vector de integración, tal como se describe anteriormente.

10 Se han desarrollado vectores de expresión y transformación, tanto replicones extracromosómicos como vectores de integración, 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; documento EP-A-O 036 259 y documento EP-A-O 063 953, documento WO 84104541], *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-O 036 776; EP-A-O 136 829 y EP-A-O 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 los estados unidos 4.745.056].

20 Se conocen bien en la técnica los procedimientos para introducir ADN exógeno en huéspedes bacterianos, y normalmente incluyen tanto la transformación de bacterias tratadas con CaCl₂ como de otros agentes, tales como cationes divalentes y DMSO. Se puede introducir también el ADN en células bacterianas mediante electroporación. Los procedimientos de transformación varían normalmente con las especies bacterianas que se van a transformar. Véanse, 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-O 036 259 y EP-A-O 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 (1988) Dower y col. (1988) Nucleic Acids Res. 16: 6127]; Kushner (1978) "An improved method for transformation of *Escherichia coli* with CoiEI-derived plasmids. En 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. Ferreti y R. Curtiss 111); Perry y col. (1981) Infect. Immun. 32: 1295; Powell y col. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54: 655, Somkuti y col. (1987) Proc. 4th Eur. Cong. Biotechnology 1: 412, *Streptococcus*].

v. Expresión en levaduras

40 Una persona normalmente experta en la técnica conoce también los sistemas de expresión en levaduras. Un promotor de levadura es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa de levadura y de iniciar la transcripción en la dirección 3' (3') de la secuencia de codificación (por ejemplo, el gen estructural) en el ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción que se sitúa normalmente próxima al extremo 5' de la secuencia de codificación. Esta región de inicio de la transcripción incluye normalmente un lugar de unión a la ARN polimerasa (la "Secuencia TATA") y un lugar de inicio de la transcripción. Un promotor de levadura puede tener también una segunda región denominada secuencia del activador en la dirección 5' (UAS), que, si está presente, es normalmente distal al gen estructural. La UAS permite la expresión regulada (inducible). Se produce la expresión constitutiva en ausencia de una UAS. La expresión regulada puede ser tanto positiva como negativa, potenciando o reduciendo por tanto la transcripción.

50 La levadura es un organismo fermentador con una ruta metabólica activa, por tanto, los enzimas que codifican las secuencias en la ruta metabólica proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Los ejemplos incluyen la alcohol deshidrogenada (ADH) (documento EP-A-0284 044), la enolasa, la glucoquinasa, la glucosa-6-fosfato isomerasa, la gliceraldehido-3- fosfato-deshidrogenasa (GAP o GAPDH), la hexoquinasa, la fosfofructoquinasa, la 3- fosfoglicerato mutasa, y la piruvato quinasa (PyK) (documento EPO-A-0 329 203). El gen PH05 de levadura, que codifica la fosfatasa ácida, proporciona también secuencias promotoras útiles [Myanohara y col. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1].

60 Adicionalmente, los promotores sintéticos que no se producen en la naturaleza funcionan también como promotores de levaduras. Por ejemplo, se puede unir las secuencias UAS de un promotor de levadura 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 de ADH unida a la región de activación de la transcripción GAP (Patentes de los estados Unidos Nos 4.876.197 y 4.880.734). Otros ejemplos de promotores híbridos incluyen promotores que están constituidos por secuencias reguladoras de cualquiera de los genes ADH2, GAL4, GAL10, OR PH05, combinados con la región de activación transcripcional de un gen de enzima glicolítico tal como GAP o PyK (documento EP-A-O 164 556). Además, un promotor de levadura puede incluir promotores que se

producen naturalmente de origen no de levadura que tienen la capacidad de unirse a la ARN polimerasa de levadura e iniciar la transcripción. Los ejemplos de dichos promotores 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 *Sacharomyces cerevisiae*", en: Plasmids of Medical, Environmental and Comercial Importante (eds. K. N. Timmis y A. Puhler); Mercerau- Puigalon y col. (1980) Gene 11: 163; Panthier y col. (1980) Curr. Genet. 2: 109].

Se puede expresar una molécula de ADN intracelularmente en levaduras. Se puede unir directamente una secuencia promotora con la molécula de ADN, en cuyo caso, el primer aminoácido en el término N de la proteína recombinante será siempre una metionina, que está codificada por el codón de inicio ATG. Si se desea, se puede escindir la metionina en el término N a partir de la proteína mediante incubación in vitro con bromuro de cianógeno.

Las proteínas de condensación proporcionan una alternativa para los sistemas de expresión de levaduras, así como en los sistemas de expresión de mamíferos, baculovirus y bacterianos. Normalmente, una secuencia de ADN que codifica la porción n terminal de una proteína endógena de levadura, u otra proteína estable, se condensa con el extremo 5' de secuencias de codificación heterólogas. Tras la expresión, esta construcción proporcionará una condensación de las dos secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, el gen de la levadura, o de la superóxido dismutasa humana (SOD), se puede unir en el término 5' de un gen extraño y expresarse en la levadura. La secuencia de ADN en la unión de las dos secuencias de aminoácidos puede codificar o no un lugar escindible. Véase por ejemplo, el documento EP-A-0 196 056. Otro ejemplo es la proteína de condensación ubiquitina. Dicha proteína de condensación se prepara con la región de la ubiquitina que retiene preferiblemente un lugar para un enzima de procesamiento (por ejemplo, la proteasa de procesamiento específica de ubiquitina) para escindir la ubiquitina a partir de la proteína extraña. Mediante este procedimiento, por tanto, se puede aislar la proteína extraña natural (por ejemplo, documento W088/024066).

Alternativamente, se pueden segregar también proteínas extrañas a partir de la célula en los medios de crecimiento creando moléculas de ADN quimérico que codifican una proteína de condensación comprendida por un fragmento de la secuencia líder que proporciona la secreción en la levadura de la proteína extraña. Preferiblemente, existen lugares de procesamiento codificados entre el fragmento líder y el gen extraño que se pueden escindir tanto in vivo como in vitro. El fragmento de la secuencia líder codifica normalmente un péptido señal comprendido por aminoácidos hidrófobos que dirigen la secreción de la proteína a partir de la célula.

Se pueden derivar las secuencias señal adecuadas que codifican el ADN a partir de los genes de las proteínas de levaduras segregadas, tales como el gen de la invertasa de levadura (documentos EP-A-O 012 873; JPO. 62.096.086) y el gen del factor A (patente de los Estados Unidos 4.588.684). Alternativamente, existen líderes de origen no de levadura, tal como un interferón líder, que proporcionan también la secreción en levaduras (documento EP-A-0 060 057).

Un tipo preferido de líderes de secreción son los que emplean un fragmento del gen del factor alfa de levadura, que contienen una secuencia señal "pre", y una región "pro". Los tipos de fragmentos del factor alfa que se pueden emplear incluyen el líder del factor alfa pre-pro de longitud completa (aproximadamente 83 restos de aminoácidos) así como los líderes del factor alfa truncado (normalmente aproximadamente 25 a aproximadamente 50 restos de aminoácidos) (Patentes de los Estados Unidos 4.546.083 y 4.870.008; documento EP-A-0 324 274). Los líderes adicionales que emplean un fragmento del líder del factor alfa que proporcionan la secreción incluye líderes del factor alfa híbrido preparado con una secuencia pre de una primera levadura, pero con una región pro de un factor alfa de una segunda levadura (por ejemplo, véase el documento W089/02463).

Normalmente, las secuencias de finalización de la transcripción reconocidas por la levadura son regiones reguladoras localizadas 3' al codón de detención de la traducción, y de esta manera, junto con el promotor, flanquean la secuencia de codificación. Estas secuencias dirigen la transcripción de un ARNm que se puede traducir en el polipéptido codificado por el ADN. Ejemplos de secuencias finalizadotas de la transcripción y de otras secuencias de finalización reconocidas por las levaduras, tales como las que codifican enzimas glicolíticos.

Normalmente, los componentes anteriormente descritos, que comprenden un promotor, la secuencia líder (si se desea), la secuencia de codificación de interés, y la secuencia de finalización de la transcripción, se introducen juntos en las construcciones de expresión. Las construcciones de expresión se mantienen a menudo en un replicón, tal como un elemento extracromosómico (por ejemplo, plásmidos) capaz de mantenimiento estable en un huésped, tal como levaduras o bacterias. El replicón puede tener dos sistemas de replicación, permitiéndole de esta manera mantenerse, por ejemplo, en la levadura, para la expresión y en el huésped procariota para la clonación y la amplificación. Los ejemplos de dichos vectores lanzadera de levaduras-bacterias incluyen YEp24 [Botstein y col. (1979) gene 8: 17-24], pCI/1 [Brake y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci USA 81: 4642-4646], e YRp17 [Stinchcomb y col. (1982) J. Mol. Biol. 158: 157]. Adicionalmente, un replicón puede ser un plásmido con un número de copias tanto elevado como bajo. Un plásmido con un número de copias elevado tendrá generalmente un número de copias que oscila entre aproximadamente 5 y aproximadamente 200, y normalmente aproximadamente 10 a aproximadamente 150. Un hospedador que contiene un plásmido con número de copias elevado tendrá preferiblemente

aproximadamente 10, y más preferiblemente al menos 20. Se puede seleccionar la entrada de un vector con un número de copias elevado o bajo, dependiendo del efecto del vector y de la proteína extraña sobre el huésped. Véase, por ejemplo, Brake y col, más arriba.

5 Alternativamente, se pueden integrar las construcciones de expresión en el genoma de la levadura con un vector de integración. Los vectores de integración contienen normalmente al menos una secuencia homóloga con un cromosoma de levadura que permite integrarse al vector, y contiene preferiblemente dos secuencias homólogas que flanquean la construcción de expresión. La integración parece ser el resultado de recombinaciones entre ADN homólogo en el vector y el cromosoma de levadura [Orr-Weaver y col. (1983) *Methods in Enzymol.* 101: 10 228-245]. Se puede dirigir un vector de integración a un locus específico en levadura seleccionando la secuencia homóloga apropiada para la inclusión en el vector. Véase Orr-Weaver y col., más arriba. Pueden integrarse una o más construcciones de expresión, que afectan posiblemente los niveles de la proteína recombinante producida [Rine y col. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 6750]. Las secuencias cromosómicas incluidas en el vector pueden producir tanto como un segmento único en el vector, lo que da como resultado la integración del vector completo, 15 como dos segmentos homólogos a los 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.

20 Normalmente, las construcciones de expresión extracromosómicas y de integración pueden contener marcadores seleccionables para permitir la selección de las cepas de levaduras que se han transformado. Los marcadores seleccionables pueden incluir genes biosintéticos que se pueden expresar en la levadura huésped, tales como ADE2, HIS4, LEU2, TRP1, y ALG7, y el gen de resistencia G418, que confiere resistencia en células de levaduras a la tunicamicina y G418, respectivamente. Además, se puede proporcionar también a la levadura un 25 marcador seleccionable adecuado con la capacidad de crecer en compuestos tóxicos, tales como metales. Por ejemplo, la presencia de GUP1 permite a la levadura crecer en presencia de iones cobre [Butt y col. (1987) *Microbiol. rev.* 51: 351].

30 Alternativamente, algunos de los componentes anteriormente descritos se pueden introducir juntos en vectores de transformación. Los vectores de transformación están comprendidos normalmente por un marcador seleccionable que se mantiene tanto en un replicón como se desarrolla en un vector de integración, tal como se describe anteriormente.

35 Se han desarrollado vectores de expresión y transformación, tanto replicones extracromosómicos como vectores de integración, para la transformación en muchas levaduras. Por ejemplo, se han desarrollado vectores de expresión para, entre otras, las siguientes levaduras: *Gandida albicans* [Kurtz, y col (1986) *Mol. Gell. Biol.* 6: 142], *Gandida maltosa* [Kunze, y col. (1985) *J. Basic Microbiol.* 25: 141], *Hansenula polymorpha* [Gieeson y col. 81986] *J. Gen. Microbiol.* 132: 3459; Roggenkamp y col. (1986) *Mol. Gen. Genet.* 202-302], *Kluyveromyces fragilis* [Das, y col. (1984) *J. Bacteria!*. 158: 1165], *Kluyveromyces lactis* [De Louvencourt y col. (1983) *J. bacteria!*. 154: 737; Van den Berg y col. (1990) *Biotechnology* 8: 135], *Pichia guillierimondii* [Kunze y col. (1985) *J. Basic 40 Microbiol.* 25: 141], *Pichia pastoris* [Gregg, y col. (1985) *Mol. Gell. Biol.* 5: 3376; Patentes de los Estados Unidos Nos 4.837.148 y 4.929.555], *Sacharomyces 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], *Yarrowia lipolytica* [Davidow, y col. (1985) *Gurr. Genet.* 10: 380471 Gaillardin, y col. (1985) *Gurr. Genet* 10:49].

45 Se conocen en la técnica los procedimientos para introducir ADN exógeno en huéspedes de levaduras, e incluyen normalmente tanto la transformación de esferoplastos como las células de levaduras intactas tratadas con cationes alcalinos los procedimientos de transformación varían normalmente con las especies de levaduras que se van a transformar. Véanse por ejemplo [kurtz y col. (1986) *Mol. Gell. Biol.* 6.142; Kunze y col. (1985) *J. Basic Microbiol.* 25: 141; *Gandida*]; [Gieeson y col. (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132: 34549; Roggenkamp y col. (1986) *Mol. 50 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) *Bioffehnology* 8: 135; *Kluyveromyces*]; [Gregg y col. (1985) *Mol. Gell. Biol.* 5: 3376; Kunze y col. (1985) *J. Basic Microbiol.* 25: 141; Patentes de los Estados Unidos Nos 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) *Gurr. 55 Genet.* 10: 39; Gaillardin y col. (1985) *Gurr. Genet.* 10: 49; *Yarrowia*].

Anticuerpos

60 Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido o grupo de polipéptidos compuesto por al menos un lugar de combinación del anticuerpo. Un "lugar de combinación del anticuerpo" es el espacio de unión tridimensional con una superficie interna con forma y distribución de carga complementarias a las características de un epítipo de un antígeno, lo que permite una unión del anticuerpo con el antígeno. "Anticuerpo" incluye, por ejemplo, anticuerpos de vertebrados, anticuerpos híbridos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos alterados, anticuerpos univalentes, proteínas Fab, y anticuerpos 65 con una única región.

Los anticuerpos contra las proteínas de la invención son útiles para la cromatografía de afinidad, los inmunoensayos, y distinguir/identificar las proteínas Neisseriales.

5 Se pueden preparar anticuerpos de las proteínas de la invención, policlonales y monoclonales, mediante procedimientos convencionales. En general, se usa en primer lugar la proteína para inmunizar un animal adecuado, preferiblemente un ratón, rata, conejo o cabra. Se prefieren conejos y cabras para la preparación de sueros policlonales debido al volumen de suero obtenible, y a la disponibilidad de anticuerpos marcados dirigidos contra conejo y dirigidos contra cabra. Se lleva a cabo generalmente la inmunización mezclando o emulsificando la
10 proteína en disolución salina, preferiblemente en un adyuvante, tal como adyuvante completo de Freund, e inyectando la mezcla o emulsión parenteralmente (generalmente por vía subcutánea o intramuscular). Una dosis de 50-200 µg/inyección es normalmente suficiente. Se estimula generalmente la inmunización 2-6 semanas más tarde con una o más inyecciones de la proteína en disolución salina, usando preferiblemente adyuvante incompleto de Freund. Se pueden generar alternativamente anticuerpos mediante inmunización in vitro usando procedimientos conocidos en la técnica, que para los objetivos de esta invención, se consideran equivalentes a la inmunización in vivo. Se obtienen antisueros policlonales sangrando al animal inmunizado en un
15 contenedor de vidrio o plástico, incubando la sangre a 25° e durante una hora, seguido por incubación a 4° e durante 2-18 horas. Se recupera el suero mediante centrifugación (por ejemplo, 1.000g durante 10 minutos). Se pueden obtener de conejos aproximadamente 20-50 ml por sangrado. Se preparan anticuerpos monoclonales usando el procedimiento estándar de Kohler-Milstein [Nature (1975) 256: 4996], o una modificación del mismo. Normalmente, se inmuniza un ratón o rata tal como se describe anteriormente. Sin embargo, más que sangrar al animal para extraer el suero, se retira y disocia el bazo (y opcionalmente algunos nódulos linfáticos grandes) en células únicas. Si se desea, se pueden cribar las células de bazo (tras la eliminación de células no específicamente adherentes) aplicando una suspensión celular a una placa o bien revestida con el antígeno de la
20 proteína. Las células B que expresan una inmunoglobulina unida a membrana específica del antígeno se unen a la placa, y no se eliminan con el enjuagado con el resto de la suspensión. Las células B resultantes, o todas las células de bazo disociadas, se inducen a continuación a fusionarse con las células de mieloma para formar hibridomas, y se cultivan en un medio selectivo (por ejemplo, medio de hipoxantina, aminopterina, timidita, "HAT"). Los hibridomas resultantes se plaquean mediante dilución limitante, y se evalúan para la producción de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno inmunizante (y que no se unen a antígenos no relacionados). Los hibridomas que segregan MAb seleccionados se cultivan a continuación tanto in vitro (por ejemplo, en botellas de cultivo de tejido o reactores de fibra hueca), como in vivo (como ascites en ratones).

Si se desea, se pueden marcar los anticuerpos (tanto policlonales como monoclonales) usando técnicas convencionales. Las marcas adecuadas incluyen fluoróforos, cromóforos, átomos radioactivos (particularmente ³²P y ¹²⁵I), reactivos densos en electrones, enzimas, y ligandos que tienen compañeros de unión específicos. Las enzimas se detectan habitualmente por su actividad. Por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante se detecta normalmente por su capacidad para convertir la 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) a un pigmento azul, cuantificable con espectrofotómetro. "Compañero de unión específico" se refiere a una proteína capaz de unirse a una molécula ligando con elevada especificidad, como por ejemplo en el caso de un antígeno y un anticuerpo monoclonal específico del anterior. Otros compañeros de unión específicos incluyen biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A y las numerosas aplicaciones receptor-ligando conocidas en la técnica. Debe entenderse que la anterior descripción no se pretende que categorice las diversas marcas en distintos tipos, ya que la misma marca puede servir de diversos modos diferentes. Por ejemplo, ¹²⁵I puede servir como una marca radioactiva o como un reactivo denso en electrones. HRP puede servir como enzima o como antígeno para una MAb. Además, se pueden combinar diversas marcas para el efecto deseado. Por ejemplo, las MAb y avidina requieren también marcas en la práctica de esta invención. De esta manera, se puede marcar un Mab con biotina, y detectar su presencia con avidina marcada con ¹²⁵I, o con una MAb dirigida contra biotina marcada con HRP. Otras permutaciones y posibilidades serán fácilmente aparentes a las personas normalmente expertas en la técnica, y se consideran como equivalentes dentro del alcance de la presente invención.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender tanto polipéptidos, anticuerpos, como un ácido nucleico de la invención. La composición farmacéutica comprenderá una cantidad terapéuticamente efectiva de cualesquiera polipéptidos, anticuerpos o polinucleótidos de la invención que se reivindica.

La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" tal como se usa en el presente documento se refiere a una cantidad de un agente terapéutico para tratar, mejorar, o evitar una enfermedad o dolencia deseada, o para presentar un efecto terapéutico o preventivo detectable. Se puede detectar el efecto mediante; por ejemplo, marcadores químicos o niveles de antígenos. El efecto terapéutico incluye también la reducción de los síntomas físicos, tales como la disminución de la temperatura corporal. La cantidad efectiva precisa para un sujeto dependerá del tamaño y la salud del sujeto, la naturaleza y extensión de la dolencia, y el tratamiento terapéutico o combinación de tratamientos terapéuticos seleccionados para la administración. De esta manera, no es útil especificar una cantidad efectiva exacta por adelantado. Sin embargo, se puede determinar la cantidad efectiva para una situación

dada mediante experimentación rutinaria y está dentro del juicio del médico especialista.

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

Una composición farmacéutica puede contener también un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo para la administración de un agente terapéutico, tal como anticuerpos o un polipéptido, genes, y otros agentes terapéuticos. El término se refiere a cualquier vehículo farmacéutico que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales al individuo que recibe la composición, y que se pueda administrar sin toxicidad indebida. Los vehículos adecuados pueden ser grandes macromoléculas que se metabolizan lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, y partículas de virus inactivos. Las personas normalmente expertas en la técnica conocen bien dichos vehículos.

Se pueden usar en la anterior 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. Está disponible 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, disolución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, pueden estar presentes en dichos vehículos sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsificantes, sustancias tamponantes del pH, y similares. Normalmente, se pueden preparar las composiciones terapéuticas se preparan como inyectables, tanto como disoluciones líquidas o como suspensiones, formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, vehículos líquidos previos a la inyección. Se incluyen liposomas dentro de la definición o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Procedimientos de administración

Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos que se van a tratar pueden ser animales, en particular, se pueden tratar sujetos humanos.

La administración directa de las composiciones se llevará a cabo generalmente mediante inyección, tanto por vía subcutánea, peritoneal, intravenosa o intramuscular, como administrada en el espacio intersticial de un tejido. Se pueden administrar también las composiciones en una lesión. Otros modos de administración incluyen la administración oral y pulmonar, supositorios, y aplicaciones transdérmicas o transcutáneas (por ejemplo, véase el documento W098/20734), agujas, y cañones génicos o hipopulverizadores. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de múltiples dosis.

Vacunas

Las vacunas comprenden antígeno(s) inmunizante, inmunógeno(s), polipéptido(s), proteína(s) o ácido nucleico, normalmente en combinación con "vehículos farmacéuticamente aceptables", que incluyen cualquier vehículo que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales en el individuo que recibe la composición. los vehículos adecuados son normalmente grandes macromoléculas que se metabolizan lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados lípidos (tales como gotículas de aceite o liposomas) y partículas de virus inactivos. Las personas normalmente expertas en la técnica conocen dichos vehículos. Adicionalmente, estos vehículos pueden funcionar como agentes de inmunostimulación ("adyuvantes"). Además, se puede conjugar el antígeno o el inmunógeno a un toxoide bacteriano, tal como un toxoide de la difteria, tétanos, cólera, H. pylori, etc., patógenos.

Los adyuvantes preferidos para potenciar la efectividad de la composición incluyen, pero no se limitan a. (1) sales de aluminio (alum), 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 de inmunostimulación específicos tales como péptidos de muramilo (véase a continuación) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como por ejemplo (a) MF59TM (documento W090/14837; capítulo 10 en Vaccine design: the subunit and adjuvant approach, eds. Powell & Newman, Plenum Press 1195), que contiene Escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 %, y Span 85 al 0,5 % (conteniendo opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE (véase a continuación), aunque no se requiere) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, que contiene Escualeno al 10 %, Tween 80 al 0,54 %, polímero L121 bloqueado con pluronic, y thr-MOP (véase a continuación) tanto microfluidizado en una emulsión submicrométrica como vortizado para generar una emulsión con tamaño de partícula más grande, y (e) sistema adyuvante RibitTM (RAS) (Ribit Immunochem, Hamilton, MT), que contiene Escualeno al 2 %, Tween 80 al 0,2 %, y

uno o más componentes de la pared celular bacteriana procedentes del grupo constituido por monofosforilípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TOM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (Oetox™), (3) se pueden usar adyuvantes de saponina, tales como Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) o partículas generadas a partir del anterior tales como ISCOM (complejos de inmunestimulación), (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, interferón gamma), factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc; y (6) otras sustancias que actúan como agentes de inmunestimulación para potenciar la efectividad de la composición. Se prefieren Alum y MF59™.

Tal como se menciona anteriormente, los péptidos de muramilo incluyen, pero no se limitan a, N-acetil-muramii-L-treonil-0-isoglutamina (thr-MOP), N-acetil-normuramii-L-alanil-0-isoglutamina (nor-MOP), N-acetilmuramii-L-alanil-0-isoglutaminii-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxfosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.

Las composiciones inmunógenas (por ejemplo, el antígeno inmunizante/inmunógeno/polipéptido/proteína/ácido nucleico, vehículo y adyuvante farmacéuticamente aceptables) contendrán normalmente diluyentes, tales como agua, disoluciones salinas, glicerol, etanol, etc. Adicionalmente, pueden estar presentes en dichos vehículos sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsificantes, sustancias tamponantes del pH, y similares.

Normalmente, las composiciones inmunógenas se preparan como inyectables, tanto como disoluciones líquidas como suspensiones; se pueden preparar formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, vehículos líquidos previos a la inyección. Se puede emulsificar o encapsular también la preparación en liposomas para potenciar el efecto adyuvante, tal como se discute anteriormente con los vehículos farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones inmunógenas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente efectiva de los polipéptidos antigénicos o inmunógenos, así como cualquier otro de los componentes anteriormente mencionados, según se necesite. Por "cantidad inmunológicamente efectiva", se entiende que la administración de esta cantidad a un individuo, tanto en una dosis única o como parte de una serie, es efectiva para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y la dolencia física del individuo que se va a tratar, el grupo taxonómico del individuo que se va a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc), la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del doctor que asiste al tratamiento de la situación médica, y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad esté comprendida en un intervalo relativamente amplio que se puede determinar mediante ensayos rutinarios.

Las composiciones inmunógenas se administran convencionalmente por vía parenteral, por ejemplo, mediante inyección, tanto subcutánea, intramuscular, o transdermal/transcutánea (por ejemplo, documento W098/20734). Las formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones orales y pulmonares, supositorios, y aplicaciones transdérmicas. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de múltiples dosis. Se puede administrar la vacuna en conjunción con otros agentes inmunoreguladores.

Como una alternativa a las vacunas basadas en proteínas, se puede emplear 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 a continuación en el presente documento].

Vehículos de administración de genes

Se pueden administrar vehículos de terapia génica para la administración de construcciones que incluyen una secuencia de codificación de una composición terapéutica de la invención, que se va a administrar al mamífero para la expresión en el mamífero tanto local como sistémicamente. Estas construcciones pueden utilizar soluciones de vectores víricos o no víricos en una modalidad in vivo o ex vivo. Se puede inducir la expresión de dicha secuencia de codificación usando promotores endógenos o heterólogos de mamífero. La expresión de la secuencia de codificación in vivo puede ser tanto constitutiva como regulada.

La invención incluye vehículos de administración de genes capaces de expresar las secuencias de ácido nucleico contempladas. El vehículo de administración de genes es preferiblemente un vector vírico y, más preferiblemente, un vector retrovírico, adenovírico, adeno- asociado vírico (AAV), herpes vírico, o de alfavirus. El vector vírico puede ser también un vector vírico de astrovirus, coronavirus, ortomixovirus, papovavirus, paramixovirus, parvovirus, picornavirus, poxvirus, o togavirus. Véanse generalmente, Jolly (1994) Cancer Gene Therapy 1:51-64; Kimura (1994) Human Gene Therapy 5: 845-852; Connelly (1995) Human Gene Therapy6: 185-193, y Kaplitt (1994) Nature Genetics 6: 148-153.

Se conocen bien en la técnica los vectores retrovéricos y los inventores contemplan que es empleable en la invención cualquier vector retrovérico para la terapia génica, incluyendo los retrovirus de tipo B, C y D, retrovirus xenotrópicos (por ejemplo, NZB-X1, NZB-X2 y NZB9-1 (véase O'Neill (1985) J. Virol. 53:160) retrovirus politrópicos, por ejemplo, MCF y MCF-MLV (véase Nelly (1983) J. Virol. 45: 291, espumavirus y lentivirus. Véase RNA Tumor Viruses, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985.

Se pueden derivar porciones del vector retrovérico para la terapia génica de diferentes retrovirus. Por ejemplo, se pueden derivar los retrovectores LTR de un Virus de Sarcoma Murino, un lugar de unión a un ARNt del virus de Sarcoma Murino, una señal de empaquetamiento de un Virus de la leucemia Murina, y un origen de síntesis de la segunda cepa de un Virus de Leucosis Aviar.

Se pueden usar estos vectores retrovéricos recombinantes para generar la transducción de partículas competentes del vector retrovérico introduciéndolas en líneas celulares de empaquetamiento apropiado (véase la patente de los Estados Unidos 5.591.624). Se pueden construir vectores retrovéricos para la integración específica del lugar en el ADN de la célula huésped mediante la incorporación de una enzima integrasa quimérica en la partícula retrovérica (véase el documento W096/37626). Es preferible que el vector vírico recombinante sea un virus recombinante defectivo en la replicación.

Se conocen bien en la técnica las líneas celulares de empaquetamiento adecuadas para el uso con los vectores retrovéricos anteriormente descritos, se preparan fácilmente (véanse los documentos W095/30763 y W092/05266), y se pueden usar para crear líneas celulares productoras (denominadas también líneas celulares del vector o "VCL") para la producción de partículas de vector recombinantes. Preferiblemente, las líneas celulares de empaquetamiento se preparan a partir de células parentales humanas (por ejemplo, células HT1080) o líneas de células parentales de visón, que eliminan la inactivación en suero humano.

Los retrovirus preferidos para la construcción de vectores retrovéricos para la terapia génica incluyen el Virus de la Leucosis Aviar, el Virus de la Leucemia Bovina, el Virus de la Leucemia Murina, Virus Inductor de Focos en Células de Visón, Virus del Sarcoma Murino, Virus de la Reticuloendoteliosis y Virus del Sarcoma de Rous. Los Virus de la Leucemia Murina particularmente preferidos incluyen 4070A y 1504A (Hartley y Rowe (1976) J Virol 19: 19-25), Abelson (ATCC N° VR-999), Friend (ATCC N° VR-245), Graffi, Gross (ATCC N° VR-590), Kirsten, Virus del Sarcoma de Harvey y Rauscher (ATCC N° VR-998) y Virus de la Leucemia Murina de Molones (ATCC N° VR-190). Se pueden obtener dichos retrovirus de depositarios o colecciones tales como la American Type Culture Collection ("ATCC") en Rockville, Maryland, o aislarse de fuentes conocidas usando las técnicas comúnmente disponibles.

Los vectores retrovéricos para la terapia génica a modo de ejemplo conocidos empleables en esta invención incluyen los descritos en las solicitudes de patente GB2200651, EP0415731, EP0345242, EP0334301, 0891 02468; W089/05349, W089/09271, W090/02806, W090/07936, W094/03622, W093/25698, W093/25234, W093/11230, W093/1 0218, W091/02805, W091/02825, W095/07994, US 5.219.740, US 4.405.712, US 4.861.719, US 4.980.289, US 4.777.127, US 5.591.624. Véanse 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; Nann (1983) Cell 33. 153; Gane (1984) Proc Natl Acad Sci 81: 6349, y Miller (1990) Human Gene Therapy 1.

Se conocen también en la técnica vectores adenovéricos humanos para la terapia génica y son empleables en esta invención. Véanse, por ejemplo, Berkner (1988) Biotechniques 6. 616 y Rosenfeld (1991) Science 252: 431, y los documentos W093/07283, W093/06223, y W093/07282. los vectores adenovéricos conocidos para la terapia génica a modo de ejemplo empleables en esta invención incluyen los descritos en los documentos anteriormente referenciados y en los documentos W094/12649, W093/03769, W093/19191, W094/28938, W095/11984, W095/00655, W095/27071, W095/29993, W095/34671, W096/05320, W094/08026, W094/11506, W093/06223, W094/24299, W095/14102, W095/24297, W095/02697, W094/28152, W094/24299, W095/09241, W095/25807, W095/05835, W094/18922 y W095/09654. Alternativamente, se puede emplear la administración de ADN unido a adenovirus muerto, tal como se describe en Curiel (1992) Hum. Gene Ther. 3. 147-154. los vehículos de administración de genes de la invención incluyen también vectores víricos asociados a adenovirus (AAV). Los ejemplos principales y preferidos de dichos vectores para uso en esta invención, son los vectores basados en AAV -2 dados a conocer en Srivastava, documento W093/09239. Los vectores de AAV más preferidos comprenden las dos repeticiones terminales invertidas de AAV en las que las secuencias D naturales se modifican mediante sustitución de nucleótidos, de tal manera que se retienen al menos 5 nucleótidos naturales y hasta 18 nucleótidos naturales, preferiblemente al menos 10 nucleótidos naturales hasta 18 nucleótidos naturales, lo más preferible 10 nucleótidos naturales y los nucleótidos restantes de la secuencia D se eliminan o sustituyen con nucleótidos no naturales. Las secuencias D naturales de las repeticiones terminales invertidas de AAV son secuencias de 20 nucleótidos consecutivos en cada repetición terminal invertida de AAV. (es decir, existe una secuencia en cada extremo) que no están implicadas en la formación de HP. El nucleótido de sustitución no natural puede ser cualquier nucleótido diferente del nucleótido que se encuentra en la secuencia D natural en la misma posición. Otros vectores de AAV a modo de ejemplo empleables son pWP-19, pWN-1, ambos cuales se dan

a conocer en Nahreini (1993) Gene 124: 257-262. Otro ejemplo de dicho vector de AAV es psub201 (véase Samulski 81987) J. Virol. 61: 3096). Otro vector de AAV a modo de ejemplo es el vector ITR Doble D. Se da a conocer la construcción del vector ITR Doble D en la Patente de los Estados Unidos 5.478.745. Otros vectores adicionales son los dados a conocer en Cartes, Patente de los Estados Unidos 4.797.368 y Muzyczka, Patente de los Estados Unidos 5.139.941; Chartejee, Patente de los Estados Unidos 5.474.935, y Kotin, documento W094/288157. Un ejemplo más adicional de un vector de AAV empleable en esta invención es SSV9AFABTKneo, que contiene el potenciador AFP y el promotor de la albúmina y dirige la expresión predominantemente en el hígado. Se dan a conocer su estructura y construcción en Su (1996) Human Gene Therapy 7: 463-470. Se describen vectores de AAV para la terapia génica adicionales en los documentos US 5.354.678, US 5.173.414, US 5.139.941, y US 5.252.479.

Los vectores para la terapia génica de la invención incluyen también vectores del herpes. Los ejemplos principales y preferidos son vectores del virus del herpes simple que contienen una secuencia de codificación que codifica un polipéptido de la timidina quinasa tal como el dado a conocer en los documentos US 5.288.641 y EP0176170 (Roizman). Los vectores víricos del herpes simple a modo de ejemplo adicionales incluyen HFEM/ICP6-LacZ dado a conocer en el documento W095/04139 (Wistar Institute), pHSVlac descrito en Geller (1988) Science 241:1667-1669 y en los documentos W090/09441 y W092/07945, HSV Us3::pgC-lacZ descrito en Fink (1992) Human Gene therapy 3. 11-19 y HSV 7134, 2RH 105 y GAL4 descritos en el documento EP 0453242 (Breakefield), y los depositados con la ATCC como números de acceso ATCC VR-977 y ATCC VR-260.

También se contemplan los vectores para terapia génica del virus alfa, que se pueden emplear en esta invención. Los vectores del virus alfa preferidos son los vectores de los virus Sindbis. Togavirus, virus del bosque Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), el virus Middleberg (ATCC VR-370), el virus del río Ross (ATCC VR-373; ATCC VR-1246), el virus de la encefalitis equina de Venezuela (ATCC VR-923, ATCC VR-1250; ATCC VR-1249; ATCC VR-532) y los descritos en las patentes de los Estados Unidos 5.091.309, 5.217.879, y el documento W092/1 0578. Más particularmente, son empleables los vectores del virus alfa descritos en el documento US con N° de Serie 08/405.627, presentado el 15 de Marzo de 1995 y los documentos W094/21792, W092/10578, W095/07994, US 5.091.309 y US 5.217.879. Se pueden obtener dichos virus alfa de depositarios o colecciones tales como la ATCC en rockville, Maryland, o aislarse de fuentes conocidas que usan técnicas comúnmente disponibles. Preferiblemente, se usan vectores de alfavirus con citotoxicidad reducida (véase el documento USSN 081679640).

Los sistemas de vectores de ADN tales como los sistemas de expresión en capas eucariotas son también útiles para expresar los ácidos nucleicos de la invención. Véase el documento W095/07994 para una descripción detallada de los sistemas de expresión en capas eucariotas. Preferiblemente, los sistemas de expresión en capas eucariotas de la invención, se derivan de vectores de alfavirus y lo más preferible de vectores de virus Sindbis.

Otros vectores víricos adecuados para el uso en la presente invención incluyen los derivados de 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-111 O y los descritos en Arnold (1990) J Cell Biochem L401; poxvirus tales como el virus de la viruela del canario o el virus vaccinia, por ejemplo ATCC VR-111 y ATCC VR-201 O 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 W089/01973; virus SV40, por ejemplo ATCC VR-797 y los virus de la gripe recombinantes preparados empleando técnicas genéticas inversas tal 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 Viral 65: 2711-2713 y Luytjes (1989) Cell 59. 110, (véanse también McMichael (1983) NEJ Med 309: 13, y Yap (1978) Nature 273: 238 y Nature (1979) 277: 108); virus de la inmunodeficiencia humana, tal como se describe en el documento EP-0386882 y en Buchschacher (1992) J. Viral. 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-64 y ATCC VR-1241; virus del Fuerte Margan, 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 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 Tanate, por ejemplo ATCC VR-925; virus Trinita, por ejemplo ATCC VR-469; virus Una, por ejemplo ATCC VR-374; virus Whataroa, por ejemplo ATCC VR-926; virus Y-62-33, por ejemplo ATCC VR-375; virus O'Nyong, virus de la encefalitis oriental, por ejemplo ATCC VR-65 y ATCC VR-1242; virus de la encefalitis occidental, por ejemplo ATCC VR-70, ATCC VR-1251, 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 esta invención en células no se limita a los vectores víricos anteriormente mencionados. Se pueden emplear otros procedimientos y medios de administración tales como, por ejemplo, vectores de expresión de ácidos nucleicos, ADN condensado policatiónico unido o no unido a adenovirus muerto solo, por ejemplo, véanse le documento US con N° de Serie 08/366.787, presentado el 30 de Diciembre de 1994 y Curiel (1992) Hum Gene Ther 3. 147-154, ADN unido a ligando, por ejemplo, véase Wu (1989) J Biol Chem

264: 16985-16987, vehículos celulares de administración a células eucariotas, por ejemplo, véanse el documento US con N° de Serie 081240.030, presentado el 9 de mayo de 1994, y el documento US con n° de Serie 08/404.796, deposición de materiales de hidrogel fotopolimerizado, cañón génico manual de transferencia de partículas, tal como se describe en la patente de los Estados Unidos 5.149.655, radiación ionizante, tal como se describe en el documento US 5.206.152 y en el documento W092/11 033, neutralización o condensación de carga nucleica con membranas celulares. Se describen soluciones adicionales en Philip (1994) Mol Cell Biol 14: 2411-2418 y en Woffendin (1994) Proc Natl Acad Sci 91: 1581-1585.

Se puede emplear la transferencia génica mediada por partículas, por ejemplo, véase el documento US con N° de Serie 60/023.867. Brevemente, se puede insertar la secuencia en vectores convencionales que contienen secuencias control convencionales para un elevado nivel de expresión, y a continuación incubarse con moléculas sintéticas de transferencia génica tales como cationes poliméricos de unión al ADN del tipo polilisina, protamina, y albúmina, unidos a ligandos que se dirigen a células tales como asialoorosomucoides, tal como se describe en Wu y Wu (1987) J. Biol. Chem. 262: 4429-4432, insulina, tal como se describe en Hucked (1990) Biochem Pharmacol 40: 253-263, galactosa, tal como se describe en Plank (1992) Bioconjugate Chem 3: 533-539, lactosa o transferrina.

Se puede emplear también ADN desnudo. Se describen procedimientos de introducción de ADN desnudo a modo de ejemplo en el documento W090/11 092 y en el documento US. 5.580.859. Se puede mejorar la eficacia de la captación usando perlas de látex biodegradables. Las perlas de látex recubiertas de ADN se transportan eficazmente en las células tras el inicio de la endocitosis por las perlas. Se puede mejorar el procedimiento adicionalmente mediante tratamiento de las perlas para aumentar la hidrofobicidad y facilitar por tanto la perturbación del endosoma y la liberación del ADN en el citoplasma.

Los liposomas que pueden actuar como vehículos de administración de genes se describen en los documentos US 5.422.120, W095/13796, W094/23697, W091/14445 y EP-524.968. Tal como se describe en el documento USSN. 601023.867, sobre la administración no vírica, se pueden insertar las secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido en vectores convencionales que contienen secuencias control convencionales para un elevado nivel de expresión, y a continuación incubarse con moléculas de transferencia de genes sintéticos tales como cationes poliméricos de unión a ADN de tipo polilisina, protamina, y albúmina, unidos a ligandos que se dirigen a células tales como asialoorosomucoides, 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 variedad de protómeros específicos de tejidos o ubicuamente activos. Además, la administración no vírica adecuada para el uso incluye sistemas de administración mecánica tales como la solución descrita en Woffendin y col (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (24): 11581-11585. Además, la secuencia de codificación y el producto de expresión de la misma se pueden administrar mediante deposición de materiales de hidrogel fotopolimerizados. Otros procedimientos convencionales para la administración de genes que se pueden usar par la administración de la secuencia de codificación incluyen, por ejemplo, el uso del cañón génico manual de transferencia de partículas, tal como se describe en el documento US 5.149.655; uso de radiación ionizante para la activación del gen transferido, tal como se describe en los documentos US 5.206.152 y W092/11 033.

Los liposomas y los vehículos de administración de genes policatiónicos a modo de ejemplo son los descritos en los documentos US 5.422.120 y 4.762.915; en los documentos W095/13796; W094/23697; y W091/14445; en el documento 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 polinucleótidos puede comprender una cantidad terapéuticamente efectiva de un vehículo de terapia génica, tal como se define el término anteriormente. Para los objetivos de la presente invención, una dosis efectiva estará entre aproximadamente 0,01 mg/kg a 50 mg/kg o 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de las construcciones de ADN en el individuo al cual se administra.

Procedimientos de administración

Una vez formuladas, las composiciones de polinucleótidos de la invención se pueden administrar (1) directamente al sujeto, (2) administrarse ex vivo, a las células derivadas procedentes del sujeto, o (3) in vitro para la expresión de proteínas recombinantes. Los sujetos que se van a tratar pueden ser mamíferos o pájaros. También, se pueden tratar seres humanos.

La administración directa de las composiciones se llevará a cabo generalmente mediante inyección, tanto subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscularmente o administrarse al espacio intersticial de un tejido. Se pueden administrar también las composiciones en una lesión. Otros modos de administración incluyen la administración oral y pulmonar, supositorios, y aplicaciones transdérmicas o transcutáneas (por ejemplo, véase documento W098/20734), agujas, y cañones génicos o hipopulverizadores. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de múltiples dosis.

Se conocen en la técnica los procedimientos para la administración y reimplante ex vivo de células transformadas en un sujeto y se describen en, por ejemplo, el documento W093/14778. Los ejemplos de células útiles en aplicaciones ex vivo incluyen, por ejemplo, citoblastos, particularmente hematopoyéticos, células linfoides, macrófagos, células dendríticas, o células tumorales.

Generalmente, se puede llevar a cabo la administración de ácidos nucleicos para aplicaciones ex vivo e in vitro mediante los siguientes procedimientos, por ejemplo, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del polinucleótido(s) en liposomas, y microinyección directa del ADN en núcleos, todos bien conocidos en la técnica.

Composiciones farmacéuticas de polinucleótidos y polipéptidos

Adicionalmente a los vehículos y sales farmacéuticamente aceptables descritos anteriormente, se pueden usar los siguientes agentes adicionales con las composiciones de polinucleótidos y/o polipéptidos.

A. Polipéptidos

Un ejemplo son los polipéptidos que incluyen, sin limitación: asioloorosomucoides (ASOR), transferrina; asialoglicoproteínas; anticuerpos; fragmentos de anticuerpos, ferritina; interleucinas, interferones, granulocitos, factor estimulador de las colonias de macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de las colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de las colonias de macrófagos (M-CSF), factor citoblástico y eritropoyetina. Se pueden usar también antígenos víricos, tales como proteínas de la envoltura. También, proteínas de otros organismos invasivos, tales como el péptido de 17 aminoácidos de la proteína del circumsporozoíto de plasmodium falciparum conocido como RII.

B. Hormonas, vitaminas, etc.

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

C. Polialquilenos, polisacáridos, etc.

También, se puede incluir polialquilenglicol con los polinucleótidos/polipéptidos deseados. En una forma de realización preferida, el polialquilenglicol es polietilenglicol. Adicionalmente, se pueden incluir mono, di, o polisacáridos. En una forma de realización de este aspecto, el polisacárido es dextrano o DEAE-dextrano. También, quitosán y poli(láctido-co-glicólido).

D. Lípidos y liposomas

Se puede encapsular también el polinucleótido/polipéptido deseado en lípidos o empaquetarse en liposomas antes de la administración al sujeto o a las células derivadas del mismo.

Se lleva a cabo generalmente la encapsulación de lípidos usando liposomas que sean capaces de unirse o atraparse de manera estable y retener el ácido nucleico. La relación de la preparación de polinucleótido condensado a lípido puede variar, pero generalmente será de alrededor de 1:1 (mg de ADN:micromoles de lípido), o más de lípido. Para una revisión del uso de liposomas como vehículos para la administración de ácidos nucleicos, véanse, Hug y Sleight (1991) Biochim. Biophys. Acta. 1097: 1-17; Straubinger (1983) Meth. Enzymol. 101:512-521.

Las preparaciones liposomales par uso en la presente invención incluyen preparaciones catiónicas (cargadas positivamente), aniónicas (cargadas negativamente) y neutras. Los liposomas catiónicos han demostrado mediar en la administración intracelular de ADN plásmido (Felgner (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84. 7413-7416); ARNm (Malone (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6077-6091), y factores de transcripción purificados (Debs (1990) J. Biol. Chem. 265. 10189-10192), en forma funcional.

Los liposomas catiónicos están fácilmente disponibles. Por ejemplo, están disponibles liposomas de N[(1-2-3-dioleiloxi) propil]-N,N,N-trietilamonio (DOTMA) bajo la marca comercial Lipofectin, de GIBCO BRL, Grand Island, NY. (Véase, también, Feigner, más arriba). Otros liposomas comercialmente disponibles incluyen transfectane (DDAB/DOPE) y DOTAP/DOPE (Boehringer). Se pueden preparar otros liposomas catiónicos a partir de materiales comercialmente disponibles usando técnicas bien conocidas en la materia. Véase, por ejemplo. Szoka (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 4194-4198; documento W090/11 092 para una descripción de la síntesis de los liposomas DOTAP de (1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio)propano).

De forma similar, están fácilmente disponibles liposomas aniónicos y neutros, tales como de Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL), o se pueden preparar fácilmente usando materiales fácilmente disponibles. Dichos materiales incluyen fosfatidil colina, colesterol, fosfatidil etanolamina, dioleoilfosfatidil colina (DOPC),

dioleoilfosfatidil glicerol (DOPG), dioleoilfosfatidil etanolamina (DOPE), entre otros. Se pueden mezclar también estos materiales con los materiales de partida de DOTMA y DOTAP en relaciones apropiadas. Se conocen bien en la técnica, los procedimientos para preparar liposomas usando estos materiales.

5 Los liposomas pueden comprender vesículas multilamelares (MLV), pequeñas vesículas unilamelares (SUV), o grandes vesículas unilamelares (LUV). Los diversos complejos de liposoma-ácido nucleico se preparan usando procedimientos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Straubinger 81983) 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, 10 Ostro (1977) Biochem. Biophys. Res. eomun. 76: 836; Fraley 81979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 3348), Enoch y Strittmatter (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 145; Fraley (1980) J. Biol. ehem. (1980) 255: 10431; Szoka y Papahadjopoulos (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 145; y Schaefer-Ridder (1982) Science 215: 166.

15 E. Lipoproteínas

Adicionalmente, se pueden incluir lipoproteínas con el polinucleótido/polipéptido que se va a administrar. Los ejemplos de lipoproteínas que se van a utilizar incluyen. quilomicrones, HDL, IDL, LDL, y VLDL. Se pueden usar también mutantes, fragmentos, o condensaciones de estas proteínas. También, se pueden usar modificaciones de las lipoproteínas que se producen naturalmente, tales como LDL acetilado. Estas proteínas pueden dirigir la 20 administración de polinucleótidos a las células que expresan los receptores de las lipoproteínas. Preferiblemente, si se incluyen lipoproteínas con el polinucleótido que se va a administrar, no se incluye otro ligando director en la composición.

25 Las lipoproteínas que se producen naturalmente comprenden una porción de lípido y una de proteína. Se conoce la porción de proteína como apoproteínas. Actualmente, se han aislado e identificado apoproteínas A, B, e, D, y E. Al menos dos de éstas contienen diversas proteínas, designadas por números romanos, AI, All, AIV; el, e11, e111.

Una lipoproteína puede comprender más de una apoproteína. Por ejemplo, los quilomicrones que se producen naturalmente comprenden A, B, e y E, con el tiempo, estas lipoproteínas pierden A y adquieren las apoproteínas C y E. VLDL comprende las apoproteínas A, B, C, y E, LDL comprende la apoproteína B; y HDL comprende las apoproteínas A, C, y E. 30

Se conocen y se describen los aminoácidos de estas apoproteínas en, por ejemplo, Breslow (1985) Annu Rev. Biochem 54: 699; Law (1986) adv. Exp med. Biol. 151. 162, ehern (1986) J. Biol ehem 261: 12918; Kane (1980) Proc Natl Acad Sci USA 77: 2465, y Utermann (1984) Hum Genet 65: 232. 35

Las lipoproteínas contienen una variedad de lípidos que incluyen, triglicéridos, colesterol (libre y ésteres), y fosfolípidos. La composición de los lípidos varía en las lipoproteínas que se producen naturalmente. Por ejemplo, los quilomicrones comprenden principalmente triglicéridos. Se puede encontrar una descripción más detallada del contenido lípido de las lipoproteínas que se producen naturalmente, por ejemplo, en Meth. Enzymol. 128 (1986). Las composiciones de los lípidos se escogen para adyugar en la conformación de la apoproteína para la actividad de unión al receptor. Se pueden escoger también las composiciones de lípidos para facilitar la interacción y la asociación hidrófoba con la molécula de unión al polinucleótido. 40

Se pueden aislar las proteínas que se producen naturalmente a partir del suero mediante ultracentrifugación, por ejemplo. Se describen dichos procedimientos en Meth. Enzymol. (más arriba); Pitas (1980) J. Biochem. 255:5454-5460 y Mahey (1979) J Clin. Invest. 64:743-750. Se pueden producir también lipoproteínas mediante procedimientos in vitro o recombinantes mediante la expresión de los genes de la apoproteína en una célula huésped deseada. Véase, por ejemplo, Atkinson (1996) Annu Rev Biophys Chem 15: 403 y Redding (1958) Biochim Biophys Acta 30: 443. Se pueden adquirir las lipoproteínas de suministradores comerciales, tales como Biomedical Technologies, Inc, Stoughton, Massachussets, EE. UU. Se puede encontrar una descripción adicional de las lipoproteínas en Zuckermann y col. documento W098/06437. 45 50

55 F. Agentes policatiónicos

Se pueden incluir agentes policatiónicos, con o sin lipoproteína, en una composición con el polinucleótido/polipéptido que se va a administrar.

Los agentes policatiónicos presentan, normalmente, una carga positiva neta a pH fisiológicamente relevante y son capaces de neutralizar la carga eléctrica de los ácidos nucleicos para facilitar la administración en una localización deseada, estos agentes tienen aplicaciones in vitro, ex vivo, e in vivo. Se pueden usar agentes policatiónicos para administrar ácidos nucleicos a un sujeto vivo intramuscular, subcutáneamente, etc. 60

Los siguientes son ejemplos de polipéptidos útiles como agentes policatiónicos: polilisina, poliarginina, poliornitina, y protamina. Otros ejemplos incluyen histonas, protaminas, albúmina de suero humano, proteínas de 65

unión al ADN, proteínas cromosómicas no de histona, proteínas de recubrimiento de los virus de ADN, tales como (X174, factores transcripcionales que contienen también regiones que se unen al ADN y pueden ser por tanto útiles como agentes adyuvantes de condensación de núcleos. Brevemente, 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, y TFIID contienen regiones básicas que se unen a las secuencias de ADN.

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

Las dimensiones y las propiedades físicas de un agente policatiónico se pueden extrapolar a partir de la lista anterior, para construir otros agentes policatiónicos polipéptidos o para producir agentes policatiónicos sintéticos. Los agentes policatiónicos sintéticos que son útiles incluyen, por ejemplo, DEAE-dextrano, polibreno. Lipofectin™ y lipofectAMINE™ son monómeros que forman complejos policatiónicos cuando se combinan con polinucleótidos/polipéptidos.

Ensayos de inmunodiagnóstico

Se pueden usar los antígenos neisseriales de la invención en inmunoensayos para detectar los niveles de anticuerpos (o, inversamente, se pueden usar anticuerpos dirigidos contra neisseria para detectar los niveles de antígeno). Se pueden desarrollar inmunoensayos basados en antígenos recombinantes bien definidos para sustituir procedimientos diagnósticos invasivos. Se pueden detectar anticuerpos de las proteínas neisseriales comprendidas dentro de las muestras biológicas, que incluyan, por ejemplo, muestras de sangre o suero. El diseño de los inmunoensayos está sujeto a un gran grado de variación, y se conoce en la técnica una variedad de estos. Los protocolos para el inmunoensayo pueden estar basados, por ejemplo, en competición, o reacción directa, o ensayos tipo sándwich. Los protocolos pueden también, por ejemplo, usar soportes sólidos, o pueden ser mediante inmunoprecipitación. La mayor parte de los ensayos implica el uso de anticuerpos o polipéptidos marcados; las marcas pueden ser, por ejemplo, fluorescentes, quimioluminiscentes, radioactivas, o moléculas colorantes. Se conocen también los ensayos que amplifican las señales de la sonda; ejemplos de los cuales son los ensayos que utilizan biotina y avidina, e inmunoensayos marcados y mediados por enzimas, tales como los ensayos ELISA.

Se construyen kits adecuados para el inmunodiagnóstico y que contienen los reactivos marcados apropiados mediante el empaquetamiento de los materiales apropiados, que incluyen las composiciones de la invención, en contenedores adecuados, solamente con los reactivos y materiales restantes (por ejemplo, tampones adecuados, disoluciones salinas, etc.) requeridos para la realización del ensayo, así como el conjunto adecuado de instrucciones del ensayo.

Hibridación de ácido nucleico

"Hibridación" se refiere a la asociación de dos secuencias de ácido nucleico entre sí mediante puentes de hidrógeno. Normalmente, se fijará una secuencia a un soporte sólido y la otra estará libre en la disolución. A continuación, se pondrán en contacto las dos secuencias entre sí en condiciones que favorezcan los puentes de hidrógeno. Los factores que afectan esta unión incluyen: el tipo y volumen del disolvente; la temperatura de reacción; el tiempo de hibridación; la agitación, los agentes que bloquean la unión no específica de la secuencia de la fase líquida con el soporte sólido (reactivo de Denhard o BLOTTO); la concentración de las secuencias; el uso de compuestos para aumentar la velocidad de asociación de las secuencias (sulfato de dextrano o polietilenglicol); y la restricción de las condiciones de lavado tras la hibridación. Véase Sambrook y col [más arriba] Volumen 2, capítulo 9, páginas 9.47 a 9.57.

"Restricción" se refiere a las condiciones en la reacción de hibridación que favorecen la asociación de secuencias muy similares con secuencias que difieren. Por ejemplo, debe escogerse la combinación de la temperatura y la concentración de sal para que sea aproximadamente de 120 a 200° C por debajo de la Tm calculada del híbrido en estudio. Se pueden determinar a menudo la temperatura y las condiciones salinas empíricamente en experimentos preliminares en los que las muestras de ADN genómico inmovilizado sobre filtros se hibridan con la secuencia de interés y a continuación se lavan en condiciones de restricción diferentes. Véase Sambrook y col, en la página 9.50.

Las variables a considerar cuando se lleva a cabo, por ejemplo, una transferencia Southern son (1) la complejidad del ADN que se está transfiriendo y (2) la homología entre la sonda y las secuencias que se están detectando. La cantidad total del fragmento(s) que se va estudiar puede variar en una magnitud de 10, entre 0, 1 y 1 µg para la digestión de un plásmido o fago de 10⁻⁹ a 10⁻⁸ para una única copia de gen en un genoma eucariota muy complejo. Para polinucleótidos de complejidad más baja, se puede usar una hibridación con transferencia sustancialmente más corta, y tiempos de exposición, una cantidad pequeña de polinucleótidos de partida, y actividad específica más baja de las sondas. Se puede detectar, por ejemplo, un gen de levadura de copia única con un tiempo de exposición de únicamente 1 hora comenzando con 1 µg de ADN de levadura, transfiriendo durante dos horas, e hibridando durante 4-8 horas con una sonda de 108 cpm/ µg. Para una única copia de un gen de mamífero, una solución conservativa podría comenzar con 10 µg de ADN, transferencia durante la noche, e hibridar durante la

noche en presencia de sulfato de dextrano al 10 % usando una sonda de más de 108 cpm/ µg, dando como resultado un tiempo de exposición de 24 horas.

5 Diversos factores pueden afectar la temperatura de fusión T_m de un híbrido de ADN-ADN entre la sonda y el fragmento de interés, y consecuentemente, las condiciones apropiadas de hibridación y lavado. En muchos casos, la sonda no es un 100 % homóloga con el fragmento. Otras variables comúnmente encontradas incluyen la longitud y el contenido total de G+C de las secuencias de hibridación y la fuerza iónica y el contenido de formamida del tampón de hibridación. Se pueden aproximar los efectos de todos estos factores mediante una única ecuación:

10
$$T_m = 81 + 16,6 (\log_{10} C_i) + 0,4 [(G+C) \%] - 0,6 (\% \text{ de formamida}) - 600 \ln^{-1},5 (\% \text{ de emparejamiento}).$$

15 en la que C_i es la concentración de sal (iones monovalentes) y n es la longitud del híbrido en los pares de bases (modificada ligeramente de la de Meinkoth y Wahl (1984) Anal. Biochem. 138: 267-284).

20 En el diseño de un experimento de hibridación, se pueden alterar convenientemente algunos factores que afectan la hibridación del núcleo. La temperatura de la hibridación y los lavados y la concentración de sal durante los lavados son los más sencillos de ajustar. A medida que la temperatura de hibridación aumenta (es decir, restricción), llega a ser menos probable que se produzca la hibridación entre las cadenas que no son homólogas, y como resultado, disminuye el fondo. Si la sonda radiomarcada no es completamente homóloga con el fragmento inmovilizado (como es frecuentemente el caso en la familia de genes y en los experimentos de hibridación interespecies), se debe reducir la temperatura de hibridación, y el fondo aumentará. La temperatura de los lavados afecta la intensidad de la banda de hibridación y el grado de fondo de una manera similar. También aumenta la restricción de los lavados disminuyendo las concentraciones salinas.

25 En general, las temperaturas de hibridación convenientes en presencia de formamida al 50 % son 42° e para una sonda con un 95 % a un 100 % de homología con el fragmento diana, 37° e para un 90 % a 95 % de homología, y 32° e para un 85 % a un 90 % de homología. Para homologías más bajas, se debe disminuir el contenido de formamida y ajustarse la temperatura de acuerdo con esto, Usando la ecuación anterior. Si no se conoce la homología entre la sonda y el fragmento anterior, la solución más sencilla es comenzar con condiciones de hibridación y lavado que no sean restrictivas. Si se observan bandas no específicas o fondo elevado tras la autorradiografía, se puede lavar el filtro con restricción elevada y volverse a exponer. Si el tiempo requerido para la exposición hace impracticable la solución, deben ensayarse en paralelo diversas restricciones de hibridación y/o lavado.

35 **Identificación de la proteína meningocócica de 80-85 kDa**

40 Se observó que algunas preparaciones de vesículas de membranas externas del serogrupo B de *N. meningitidis* contenían un componente de aproximadamente 80-85 kDa. Se purificó esta proteína a partir de geles de SDS-PAGE y se secuenció N terminalmente (SEQ DE ID 1).

45 Los anticuerpos aumentados contra la proteína purificada mediante SDS-PAGE reaccionaron en cruzado con las proteínas equivalentes en más de 50 cepas de *N. meningitidis* de diversos serogrupos y serotipos. Se observó también reactividad cruzada con *N. gonorrhoeae*, *N. polysaccharia* y *N. lactamica*. Los sueros post-inmunes de los pacientes vacunados reaccionaron también con la proteína.

50 Se clonó el gen completo a partir del serogrupo B de *N. meningitidis* (SEe DE ID 2) y se infirió la proteína codificada (SEQ DE ID 3). Mediante la comparación con la secuenciación N terminal descrita anteriormente, se infirieron un péptido señal (SEQ DE ID 4) y una secuencia madura (SEQ DE ID 5).

Identificación de los genes correspondientes en el serogrupo A de *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*.

55 Sobre la base de la secuencia del serogrupo B de *N. meningitidis*, se clonaron y se secuenciaron los genes correspondientes del serogrupo A de *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*.

Se muestra en la SEC DE ID 6 el gen completo del serogrupo A de *N. meningitidis*, con la proteína codificada en la SEC DE ID 7. El péptido señal y la secuencia madura son las SEC DE ID 8y 9.

60 Se muestra en la SEC DE ID 10 el gen completo de *N. gonorrhoeae*, con la proteína codificada en la SEC DE ID 11. El péptido señal y la secuencia madura son las SEC DE ID 12 y 13.

Comparaciones de secuencias

65 Se compararon las secuencias de proteínas y son muy homólogas.

ES 2 507 100 T3

La secuencia del serogrupo B de *N. meningitidis* y la secuencia de *N. gonorrhoeae* muestran un 95,4% de identidad en un solapamiento de 797 aa.

		10	20	30	40	50	60
5	orf21.pep	MKLKQIASALMMLGISPLALADFTIQDIRVEGLQRTEPSTVFNYLPVKVGDYNDTHGSA					
	orf21ng.pep	MKLKQIASALMMLGISPLAFADFTIQDIRVEGLQRTEPSTVFNYLPVKVGDYNDTHGSA					
		10	20	30	40	50	60
10	orf21.pep	IIKSLYATGFFDDVRVETADGQLLLTVIERPTIGSLNITGAKMLQNDAIKKNLESFGLAQ					
	orf21ng.pep	IIKSLYATGFFDDVRVETADGQLLLTVIERPTIGSLNITGAKMLQNDAIKKNLESFGLAQ					
		70	80	90	100	110	120
15	orf21.pep	SQYFNQATLNQAVAGLKEEYLGRGKLNIIQITPKVTKLARNRVDIDITIDEGKSAKITDIE					
	orf21ng.pep	SQYFNQATLNQAVAGLKEEYLGRGKLNIIQITPKVTKLARNRVDIDITIDEGKSAKITDIE					
		130	140	150	160	170	180
20	orf21.pep	FEGNQVYSDRKLMRQMSLTEGGIWTWLTRSNQFNEQKFAQDMEKVDFYQNNGYDFRIL					
	orf21ng.pep	FEGNQVYSDRKLMRQMSLTEGGIWTWLTRSDRFDRQKFAQDMEKVDFYQNNGYDFRIL					
		190	200	210	220	230	240
25	orf21.pep	DTDIQTNEDKTKQTIKITVHEGGRFRWGKVSIEGDTNEVPKAELEKLLTMKPGKWYERQQ					
	orf21ng.pep	DTDIQTNEDKTRQTIKITVHEGGRFRWGKVSIEGDTNEVPKAELEKLLTMKPGKWYERQQ					
		250	260	270	280	290	300
30	orf21.pep	MTAVLGEIQNRMGSAGYAYSEISVQPLPNAETKTVDVFLHIEPGRKIYVNEIHITGNKNT					
	orf21ng.pep	MTAVLGEIQNRMGSAGYAYSEISVQPLPNAGTKTVDVFLHIEPGRKIYVNEIHITGNKNT					
		310	320	330	340	350	360
35	orf21.pep	RDEVVRRELQRMESAPYDTSKLQRSKERVLLGYFDNVQFQDAVPLAGTFDKVDLNMSLTE					
	orf21ng.pep	RDEVVRRELQRMESAPYDTSKLQRSKERVLLGYFDNVQFQDAVPLAGTFDKVDLNMSLTE					
		370	380	390	400	410	420
40	orf21.pep	RSTGSLDLSAGWVQDTGLVMSAGVSQDNLFQGTGKSAALRASRSKTTLNGLSFTDPYFTA					
	orf21ng.pep	RSTGSLDLSAGWVQDTGLVMSAGVSQDNLFQGTGKSAALRASRSKTTLNGLSFTDPYFTA					
		430	440	450	460	470	480
45	orf21.pep	DGVSLGYDVYGFKAFDPRKASTSIKQYKTTTAGAGIRMSVPVTEYDRVNFGLVAEHLTVNT					
	orf21ng.pep	DGVSLGYDIYGFKAFDPRKASTSVKQYKTTTAGGGVVRMGI PVTEYDRVNFGLAAEHLTVNT					
		490	500	510	520	530	540
50	orf21.pep	YNKAPKHYADFIKKYKGTGDTGDSFKGWLYKGTVGWGRNKTDASALWPTRGYLTGVNAEIA					
	orf21ng.pep	YNKAPKRYADFIKRYKGTGADGDSFKGLLYKGTVGWGRNKTDASASWPTRGYLTGVNAEIA					
		550	560	570	580	590	600
55	orf21.pep	LPGSKLQYYSATHNQWFFPLSKFTLMLGGEVGIAGGYGRTKEIPFFENFYGGGLGSRV					
	orf21ng.pep	LPGSKLQYYSATHNQWFFPLSKFTLMLGGEVGIAGGYGRTKEIPFFENFYGGGLGSRV					
		610	620	630	640	650	660
60	orf21.pep	GYESGTLGPKVYDEYGEKISYGGNKKANVSAELLFPMPGAKDARTVRLSLFADAGSVWDG					
	orf21ng.pep	GYESGTLGPKVYDEYGEKISYGGNKKANVSAELLFPMPGAKDARTVRLSLFADAGSVWDG					
		670	680	690	700	710	720
65	orf21.pep	KTYDDNSSATGGRVQNIYGAGNTHKSTFTNELRYSAGGAVTWLSPLGPMKFSYAYPLKK					
		: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :					

ES 2 507 100 T3

```
orf21ng.pep  RTY----TAAENGNNKSVYSE-NAHKSTFTNELRYSAGGAVTWLSPLGPMKFSYAYPLKK
              730          740          750          760          770
              790
orf21.pep     KPEDEIQRFFQFLGTF
              |||
orf21ng.pep   KPEDEIQRFFQFLGTFX
              780          790
```

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Las secuencias de los serogrupos A y B de N. meningitidis muestran un 99,9 % de identidad en un solapamiento de 797 aa:

ES 2 507 100 T3

		10	20	30	40	50	60
	orf21.pep	MKLKQIASALMMLGISPLALADFTIQDIRVEGLQRTEPSTVFNYLPVKVGDYNDTHGSA					
5	orf21a.pep	:					
		10	20	30	40	50	60
	orf21.pep	IIKSLYATGFFDDVRVETADGQLLLTVIERPTIGSLNITGAKMLQNDAIKKNLESFGLAQ					
10	orf21a.pep						
		70	80	90	100	110	120
	orf21.pep	SQYFNQATLNQAVAGLKEEYLGRGKLNQITPKVTKLARNRVDIDITIDEGKSAKITDIE					
15	orf21a.pep						
		130	140	150	160	170	180
	orf21.pep	FEGNQVYSRDKLMRQMSLTEGGIWTWLRNSQFNEQKFAQDMEKVTDFYQNNGYFDFRIL					
20	orf21a.pep						
		190	200	210	220	230	240
	orf21.pep	DTDIQTNEDKTKQTIKITVHEGGRFRWGWKVSIEGDTNEVPKAELEKLLTMKPGKWYERQQ					
25	orf21a.pep						
		250	260	270	280	290	300
	orf21.pep	MTAVLGEIQNRMGSAAYSEISVQPLPNAETKTVDVFLHIEPGRKIYVNEIHITGNKNT					
30	orf21a.pep						
		310	320	330	340	350	360
	orf21.pep	RDEVVRRELQMESAPYDTSKLQRSKERVLLGYFDNVQFDVAVPLAGTPDKVDLNMSLTE					
35	orf21a.pep						
		370	380	390	400	410	420
	orf21.pep	RSTGSLDLSAGWVQDTGLVMSAGVSQDNLFGTGKSAALRASRSKTTLNGSLSFTDPYFTA					
40	orf21a.pep						
		430	440	450	460	470	480
	orf21.pep	DGVS LGYDVY GKAFDPRKASTSIKQYKTTTAGAGIRMSVPVTEYDRVNFGLVAEHLTVNT					
45	orf21a.pep						
		430	440	450	460	470	480
	orf21.pep	DGVS LGYDVY GKAFDPRKASTSIKQYKTTTAGAGIRMSVPVTEYDRVNFGLVAEHLTVNT					
50	orf21a.pep						
		490	500	510	520	530	540
	orf21.pep	YNKAPKHYADFIKKYKGTGTDGSFKGWLYKGTVGWGRNKTDLSALWPTRGYLTGVNAEIA					
55	orf21a.pep						
		550	560	570	580	590	600
	orf21.pep	YNKAPKHYADFIKKYKGTGTDGSFKGWLYKGTVGWGRNKTDLSALWPTRGYLTGVNAEIA					
60							
65							

Grupo	OMV noruega	Antígeno de NmB*	Antígeno de NmC	Actividad bactericida contra la cepa 2996 de NmB
1	+	-	-	< 4
2	+	Nº 1	-	512
3	+	Nº 2	-	> 2048
4	+	Nº 3	-	1024
5	+	Nº 3	+	256
6	-	Nº 3	-	2048
7	-	Nº 3	+	2048

* Se usaron tres antígenos diferentes de NmB:
 Nº 1: ORF1-por ejemplo 77 del documento WO99/24578 (véase también el documento WO99/55873)
 Nº 2: proteína '287' – por ejemplo, Figura 21 del documento WO99/57280 (también las SEC DE ID 3103-3108)
 Nº 3: una mezcla en Al(OH)₃ de Nº 1 y Nº 2 y la proteína '919' (SEC DE ID 14 en el presente documento; véanse también la Figura 23 del documento WO99/57280 y las SEC DE ID 3069-3075 en el presente documento).

Se puede observar fácilmente que se puede superar la falta de eficacia de la vacuna de OMV noruega contra la cepa 2996 (grupo 1) añadiendo antígenos definidos de la cepa 2996. Los resultados usando la proteína '287' de NmB son particularmente buenos. Puede mejorarse de esta manera la vacuna noruega sin necesidad de preparar las OMV de numerosas cepas diferentes.

Esta vacuna ofrece también protección contra las cepas menB heterólogas. Se ensayaron las mismas vacunas, preparadas usando las proteínas de la cepa 2996, contra otras cinco cepas. Los títulos fueron como sigue:

Grupo	2996	BZ133	BZ232	1000	MC58	NGH38
1	< 4	1024	< 4	> 2048	> 2048	32
2	512	512	< 4	> 2048	> 2048	256
3	4096	4096	256	1024	< 2048	1024
4	1024	2048	< 4	2048	> 2048	64
5	256	> 32000	< 4	> 2048	> 2048	128
6	2048	2048	4	< 4	64	4
7	2048	> 32000	4	128	1024	128
Control*	32768	4096	8192	16384	16384	8192

* Controles: cepas 2996, BZ133 y 1000 = OMV preparadas a partir de la cepa homóloga;
 Cepa BZ232 = OMV preparadas a partir de 2996; MC58 y NGH38 = SEAM3

Un segundo estudio suplementó OMV noruegas con proteínas de la cepa 2996 de NmB:

- proteína 919, expresada en E. coli sin compañero de fusión
- ORF1, expresada en E. coli como una condensación etiquetada con His
- Proteína 287, expresada en E. coli como una condensación GST
- Una mezcla de estas tres proteínas, opcionalmente con el conjugado de NmC.

Se adyuvaron las preparaciones con Al(OH)₃ y se ensayaron contra la cepa homóloga usando el ensayo bactericida. Los resultados son como sigue:

	NmB			NmC	
Antígeno	2996	NGH38	394/98	C11	BZ133
OMV	< 4	32	1024*	< 4	1024
+919	< 4	< 4	4	< 4	512
+ORF1	512	256	2048	4096	512
+287	4096	1024	1024	512	4096
+mix	1024	64	4	64	2048
+mix +NmC	256	128	2048	64000	> 32000

* los anticuerpos eran bacteriostáticos, no bactericidas

Trabajo adicional con el antígeno 287

Se investigaron adicionalmente las combinaciones de las OMV noruegas con el antígeno 287. Se combinaron 20 µg del antígeno 287 con la vacuna de OMP noruega (15 µg de OMP + Al(OH₃) y se usaron para inmunizar ratones. Se ensayaron los anticuerpos en el ensayo bactericida, y fueron efectivos contra todas las cepas ensayadas. Los resultados fueron como sigue:

	NmB							NmA	NmC
Antígeno	2996	BZ133	BZ232	1000	MC58	NGH38	NZ	F6124	C11
OMV	< 4	1024	< 4	> 2048	32768	32	< 4	-	-
287	8000	4096	256	< 4	512	2048	1024	1024	2048
OMV+287	4096	4096	256	1024	4096	1024	1024	-	-

En casi todos los casos, por tanto, la combinación de las OMV + proteína 287 proporciona sorprendentemente mejores resultados que las OMV solas.

OMV recombinantes

Se transformó E. coli para expresar ORF1, ORF40 y ORF46. Las OMV preparadas a partir de E. coli recombinante fueron capaces de inducir anticuerpos bactericidas contra N. meningitidis.

Se expresaron ORF1, ORF40 y ORF46 (cepa 2996) como condensaciones etiquetadas con His en E. coli y se prepararon tanto como proteínas puras o como en forma de OMV. Se ensayaron los títulos bactericidas contra ambas preparaciones usando la cepa 2996 como estímulo:

Antígeno:	ORF1	ORF40	ORF46
Purificado	64	2048	16000
OMV	1024	256	128000

Se midieron también los títulos bactericidas usando cepas de estímulo heterólogas. ORF46 proporciona un título contra la cepa MC58 de 4096 en forma pura, pero éste aumenta a 32000 cuando está en forma de las OMV. ORF1 proporciona un título contra la cepa F6124 de NmA de 128 en forma pura, pero éste aumenta a 512 cuando está en forma de las OMV. ORF40 proporciona un título contra MC58 de 512 en forma pura, pero este se duplica cuando está en forma de las OMV.

Estos datos muestran que los antígenos de NmB retienen la inmunogenicidad cuando se preparan en E. coli como OMV, adicionalmente, se puede potenciar realmente esta inmunogenicidad.

ES 2 507 100 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS SRL
 <120> SUPPLEMENTED OMV VACCINE AGAINST MENINGOCOCCUS

<130> P047556EP
 5 <141> 2001-01-17
 <150> GB-0001067.8
 <151> 2000-01-17
 10 <150> GB-0005699.4
 <151> 2000-03-09
 <160> 14
 15 <170> SeqWin99, version 1.02
 <210> 1
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 1
 25 Asp Phe Thr Ile Gln Asp Ile Arg Val Glu Gly Leu Gln Arg Thr
 1 5 10 15
 <210> 2
 <211> 2394
 30 <212> ADN
 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 2
 35 atgaaactga aacagattgc ttccgcactg atgatggttg gcatatcgcc tttggcactt 60
 gccgacttca ccatccaaga catccgcgtc gaaggcttgc agcgtaccga gccgagtacc 120
 gtattcaact acctgcccgt caaagtcggc gacacctaca acgacacaca cggcagtgcc 180
 40 atcatcaaaa gcctgtacgc caccggtttc tttgacgacg tacgcgtcga aactgcggac 240
 gggcagctcc tgctgaccgt tatcgaacgc cccaccatcg gctcgtctca catcaccggc 300
 gcaaaaatgc tgcaaaacga cgccattaag aaaaacctcg aatcgttcgg gctggcgcag 360
 tcgcaatact ttaatcaggc gacactcaat caggcagtcg ccggcctgaa agaagaatac 420
 ctcgggcgcg gcaaaactca tatccaaatc acgccc aaag taaccaaaact cgcccgaac 480
 45 cgcgtcgaca tcgacatcac gattgacgag ggcaaatccg ccaaaatcac cgacatcgaa 540
 tttgaaggca accaagtcta ttccgaccgc aaactgatgc ggcaaatgtc cctgaccgaa 600
 ggcggcattt ggacatggct gacacgaagc aaccaattca acgagcagaa atttgcccaa 660
 gatatggaaa aagtaaccga cttctaccaa aataacggct acttcgattt ccgtatcctc 720
 gataccgaca tccaaaccaa cgaagacaaa accaagcaga ccatcaaaat caccgtccac 780
 50 gaaggcggac gtttccgttg gggcaaagtc tccatcgaag gcgacaccaa cgaagtcccc 840
 aaagccgaac tggaaaaact gctgaccatg aagcccggca aatggtacga acgccagcag 900
 atgaccgccc ttttgggtga gattcagaac cgcattgggt cggcaggcta cgcatacagc 960
 gaaatcagcg tacagccgct gccgaacgct gaaaccaaaa ccgtcgtatt cgtcctgcac 1020
 atcgaaccgg gccggaaaat ctacgtcaac gaaatacaca tcaccggcaa caacaaaacc 1080
 55 cgcgacgaag tcgtccgccc tgaattacgc caaatggaat ccgcacctta cgacacctcc 1140
 aagctgcaac gttccaaaga gcgcgtcgag cttttgggct acttcgacaa tgtccagttt 1200
 gatgctgtcc cgcttgcccg caccgcccgc aaagtgcgatt tgaacatgag tctgaccgaa 1260
 cgttccaccg gttccctgga ttgagcgcg ggttgggttc aagataccgg gttggtcatg 1320
 tccgcaggcg tttcccaaga caacctgttc ggtacgggca agtcggccgc actgcgcgcc 1380
 60 tccaggagca aaaccacgct taacggctcg ctgtcgttta ctgaccgta cttcacggca 1440
 gacggggtca gcctgggcta cgatgtttac ggaaaagcct tcgaccgccc caaagcatcg 1500
 accgcatca aacaatataa aaccaccacg gcaggcgagc gcatccgcat gagcgtgcct 1560

65

ES 2 507 100 T3

5 gttaccgaat acgaccgcgt gaatttcggt ttggtggcag aacacctgac cgtcaacacc 1620
 tacaacaaag cgcccaaaaca ctatgccgac tttatcaaga aatacggcaa aaccgacggc 1680
 acagacggca gcttcaaagg ctggctgtac aaaggtaccg tcggctgggg gcgcaacaaa 1740
 accgacagcg cgttatggcc gacgcgcggc tacctgacgg gcgtgaacgc cgaatcgcc 1800
 ctgcctggca gcaaactgca atactactcc gccaccaca accaaacctg gttcttcccc 1860
 ctgagcaaaa ccttcacgct gatgctcggc ggcgaagtgc gcattgcggg cggctacggc 1920
 agaaccaaaag aaatcccctt ctttgaaaac ttctacggcg gcggcctggg ttcggtgcgc 1980
 ggatacgaag gcggcacgct cggtcgaaa gtctatgacg aatacggcga aaaatcagc 2040
 10 tacggcggca acaaaaaagc caacgtctcc gccgagctgc tcttcccgat gcccggcgcg 2100
 aaagacgcgc gcaccgtccg cctgagcctg tttgccgacg caggcagcgt gtgggacggc 2160
 aaaacctacg acgacaacag cagttccgcg accggcggca gggttcaaaa catttacggc 2220
 gccggcaata cccataaatc cacctttacc aacgaattgc gctattccgc cggcggcgcg 2280
 gttacctggc tctcgctttt aggcccgatg aaattcagct acgcctaccc gctgaagaaa 2340
 15 aaaccggaag acgaaatcca acgcttccaa ttccaactcg gcacgacggt ctaa 2394

<210> 3

<211> 797

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

20

<400> 3

25 Met Lys Leu Lys Gln Ile Ala Ser Ala Leu Met Met Leu Gly Ile Ser
 1 5 10 15
 30 Pro Leu Ala Leu Ala Asp Phe Thr Ile Gln Asp Ile Arg Val Glu Gly
 20 25 30
 35 Leu Gln Arg Thr Glu Pro Ser Thr Val Phe Asn Tyr Leu Pro Val Lys
 35 40 45
 Val Gly Asp Thr Tyr Asn Asp Thr His Gly Ser Ala Ile Ile Lys Ser
 50 55 60
 35 Leu Tyr Ala Thr Gly Phe Phe Asp Asp Val Arg Val Glu Thr Ala Asp
 65 70 75 80
 40 Gly Gln Leu Leu Leu Thr Val Ile Glu Arg Pro Thr Ile Gly Ser Leu
 85 90 95
 45 Asn Ile Thr Gly Ala Lys Met Leu Gln Asn Asp Ala Ile Lys Lys Asn
 100 105 110
 50 Leu Glu Ser Phe Gly Leu Ala Gln Ser Gln Tyr Phe Asn Gln Ala Thr
 115 120 125
 55 Leu Asn Gln Ala Val Ala Gly Leu Lys Glu Glu Tyr Leu Gly Arg Gly
 130 135 140
 60 Lys Leu Asn Ile Gln Ile Thr Pro Lys Val Thr Lys Leu Ala Arg Asn
 145 150 155 160
 55 Arg Val Asp Ile Asp Ile Thr Ile Asp Glu Gly Lys Ser Ala Lys Ile
 165 170 175
 60 Thr Asp Ile Glu Phe Glu Gly Asn Gln Val Tyr Ser Asp Arg Lys Leu
 180 185 190
 65 Met Arg Gln Met Ser Leu Thr Glu Gly Gly Ile Trp Thr Trp Leu Thr
 195 200 205
 Arg Ser Asn Gln Phe Asn Glu Gln Lys Phe Ala Gln Asp Met Glu Lys

ES 2 507 100 T3

	210					215						220				
5	Val 225	Thr	Asp	Phe	Tyr	Gln 230	Asn	Asn	Gly	Tyr	Phe 235	Asp	Phe	Arg	Ile	Leu 240
	Asp	Thr	Asp	Ile	Gln 245	Thr	Asn	Glu	Asp	Lys 250	Thr	Lys	Gln	Thr	Ile	Lys 255
10	Ile	Thr	Val	His 260	Glu	Gly	Gly	Arg	Phe 265	Arg	Trp	Gly	Lys	Val	Ser	Ile 270
	Glu	Gly	Asp	Thr	Asn	Glu	Val	Pro 280	Lys	Ala	Glu	Leu	Glu	Lys	Leu	Leu 285
15	Thr	Met	Lys	Pro	Gly	Lys	Trp 295	Tyr	Glu	Arg	Gln	Gln	Met	Thr	Ala	Val 300
20	Leu 305	Gly	Glu	Ile	Gln	Asn 310	Arg	Met	Gly	Ser	Ala	Gly	Tyr	Ala	Tyr	Ser 320
	Glu	Ile	Ser	Val	Gln 325	Pro	Leu	Pro	Asn	Ala	Glu	Thr	Lys	Thr	Val	Asp 335
25	Phe	Val	Leu	His 340	Ile	Glu	Pro	Gly	Arg	Lys	Ile	Tyr	Val	Asn	Glu	Ile 350
30	His	Ile	Thr	Gly 355	Asn	Asn	Lys	Thr	Arg	Asp	Glu	Val	Val	Arg	Arg	Glu 365
	Leu	Arg	Gln	Met	Glu	Ser	Ala 375	Pro	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Gln	Arg 380
35	Ser 385	Lys	Glu	Arg	Val	Glu 390	Leu	Leu	Gly	Tyr	Phe 395	Asp	Asn	Val	Gln	Phe 400
40	Asp	Ala	Val	Pro	Leu 405	Ala	Gly	Thr	Pro	Asp	Lys	Val	Asp	Leu	Asn	Met 415
	Ser	Leu	Thr	Glu 420	Arg	Ser	Thr	Gly	Ser	Leu	Asp	Leu	Ser	Ala	Gly	Trp 430
45	Val	Gln	Asp	Thr	Gly	Leu	Val	Met 440	Ser	Ala	Gly	Val	Ser	Gln	Asp	Asn 445
50	Leu 450	Phe	Gly	Thr	Gly	Lys	Ser	Ala	Ala	Leu	Arg	Ala	Ser	Arg	Ser	Lys 460
	Thr	Thr	Leu	Asn	Gly	Ser 470	Leu	Ser	Phe	Thr	Asp	Pro	Tyr	Phe	Thr	Ala 480
55	Asp	Gly	Val	Ser	Leu 485	Gly	Tyr	Asp	Val	Tyr	Gly	Lys	Ala	Phe	Asp	Pro 495
60	Arg	Lys	Ala	Ser 500	Thr	Ser	Ile	Lys	Gln 505	Tyr	Lys	Thr	Thr	Thr	Ala	Gly 510
	Ala	Gly	Ile	Arg	Met	Ser	Val	Pro 520	Val	Thr	Glu	Tyr	Asp	Arg	Val	Asn 525
65	Phe 530	Gly	Leu	Val	Ala	Glu	His 535	Leu	Thr	Val	Asn	Thr	Tyr	Asn	Lys	Ala 540

ES 2 507 100 T3

Pro Lys His Tyr Ala Asp Phe Ile Lys Lys Tyr Gly Lys Thr Asp Gly
 545 550 555 560
 5 Thr Asp Gly Ser Phe Lys Gly Trp Leu Tyr Lys Gly Thr Val Gly Trp
 565 570 575
 10 Gly Arg Asn Lys Thr Asp Ser Ala Leu Trp Pro Thr Arg Gly Tyr Leu
 580 585 590
 Thr Gly Val Asn Ala Glu Ile Ala Leu Pro Gly Ser Lys Leu Gln Tyr
 595 600 605
 15 Tyr Ser Ala Thr His Asn Gln Thr Trp Phe Phe Pro Leu Ser Lys Thr
 610 615 620
 20 Phe Thr Leu Met Leu Gly Gly Glu Val Gly Ile Ala Gly Gly Tyr Gly
 625 630 635 640
 Arg Thr Lys Glu Ile Pro Phe Phe Glu Asn Phe Tyr Gly Gly Gly Leu
 645 650 655
 25 Gly Ser Val Arg Gly Tyr Glu Ser Gly Thr Leu Gly Pro Lys Val Tyr
 660 665 670
 30 Asp Glu Tyr Gly Glu Lys Ile Ser Tyr Gly Gly Asn Lys Lys Ala Asn
 675 680 685
 Val Ser Ala Glu Leu Leu Phe Pro Met Pro Gly Ala Lys Asp Ala Arg
 690 695 700
 35 Thr Val Arg Leu Ser Leu Phe Ala Asp Ala Gly Ser Val Trp Asp Gly
 705 710 715 720
 40 Lys Thr Tyr Asp Asp Asn Ser Ser Ser Ala Thr Gly Gly Arg Val Gln
 725 730 735
 Asn Ile Tyr Gly Ala Gly Asn Thr His Lys Ser Thr Phe Thr Asn Glu
 740 745 750
 45 Leu Arg Tyr Ser Ala Gly Gly Ala Val Thr Trp Leu Ser Pro Leu Gly
 755 760 765
 50 Pro Met Lys Phe Ser Tyr Ala Tyr Pro Leu Lys Lys Lys Pro Glu Asp
 770 775 780
 Glu Ile Gln Arg Phe Gln Phe Gln Leu Gly Thr Thr Phe
 785 790 795

55 <210> 4
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

60 <400> 4

65

ES 2 507 100 T3

Met Lys Leu Lys Gln Ile Ala Ser Ala Leu Met Met Leu Gly Ile Ser
1 5 10 15
5
Pro Leu Ala Leu Ala
20
10 <210> 5
<211> 776
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis
15 <400> 5
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

ES 2 507 100 T3

Asp Phe Thr Ile Gln Asp Ile Arg Val Glu Gly Leu Gln Arg Thr Glu
 1 5 10 15
 5 Pro Ser Thr Val Phe Asn Tyr Leu Pro Val Lys Val Gly Asp Thr Tyr
 20 25 30
 Asn Asp Thr His Gly Ser Ala Ile Ile Lys Ser Leu Tyr Ala Thr Gly
 35 40 45
 10 Phe Phe Asp Asp Val Arg Val Glu Thr Ala Asp Gly Gln Leu Leu Leu
 50 55 60
 15 Thr Val Ile Glu Arg Pro Thr Ile Gly Ser Leu Asn Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80
 Lys Met Leu Gln Asn Asp Ala Ile Lys Lys Asn Leu Glu Ser Phe Gly
 85 90 95
 20 Leu Ala Gln Ser Gln Tyr Phe Asn Gln Ala Thr Leu Asn Gln Ala Val
 100 105 110
 Ala Gly Leu Lys Glu Glu Tyr Leu Gly Arg Gly Lys Leu Asn Ile Gln
 115 120 125
 25 Ile Thr Pro Lys Val Thr Lys Leu Ala Arg Asn Arg Val Asp Ile Asp
 130 135 140
 30 Ile Thr Ile Asp Glu Gly Lys Ser Ala Lys Ile Thr Asp Ile Glu Phe
 145 150 155 160
 Glu Gly Asn Gln Val Tyr Ser Asp Arg Lys Leu Met Arg Gln Met Ser
 165 170 175
 35 Leu Thr Glu Gly Gly Ile Trp Thr Trp Leu Thr Arg Ser Asn Gln Phe
 180 185 190
 40 Asn Glu Gln Lys Phe Ala Gln Asp Met Glu Lys Val Thr Asp Phe Tyr
 195 200 205
 Gln Asn Asn Gly Tyr Phe Asp Phe Arg Ile Leu Asp Thr Asp Ile Gln
 210 215 220
 45 Thr Asn Glu Asp Lys Thr Lys Gln Thr Ile Lys Ile Thr Val His Glu
 225 230 235 240
 50 Gly Gly Arg Phe Arg Trp Gly Lys Val Ser Ile Glu Gly Asp Thr Asn
 245 250 255
 Glu Val Pro Lys Ala Glu Leu Glu Lys Leu Leu Thr Met Lys Pro Gly
 260 265 270
 55 Lys Trp Tyr Glu Arg Gln Gln Met Thr Ala Val Leu Gly Glu Ile Gln
 275 280 285
 60 Asn Arg Met Gly Ser Ala Gly Tyr Ala Tyr Ser Glu Ile Ser Val Gln

65

ES 2 507 100 T3

	290					295					300					
5	Pro 305	Leu	Pro	Asn	Ala	Glu 310	Thr	Lys	Thr	Val	Asp 315	Phe	Val	Leu	His	Ile 320
	Glu	Pro	Gly	Arg	Lys 325	Ile	Tyr	Val	Asn	Glu 330	Ile	His	Ile	Thr	Gly 335	Asn
10	Asn	Lys	Thr	Arg 340	Asp	Glu	Val	Val	Arg 345	Arg	Glu	Leu	Arg	Gln 350	Met	Glu
15	Ser	Ala	Pro 355	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys 360	Leu	Gln	Arg	Ser	Lys 365	Glu	Arg	Val
	Glu	Leu	Leu	Gly	Tyr	Phe	Asp 375	Asn	Val	Gln	Phe	Asp 380	Ala	Val	Pro	Leu
20	Ala 385	Gly	Thr	Pro	Asp	Lys 390	Val	Asp	Leu	Asn	Met 395	Ser	Leu	Thr	Glu	Arg 400
25	Ser	Thr	Gly	Ser	Leu 405	Asp	Leu	Ser	Ala	Gly 410	Trp	Val	Gln	Asp	Thr 415	Gly
	Leu	Val	Met	Ser	Ala	Gly	Val	Ser	Gln 425	Asp	Asn	Leu	Phe	Gly 430	Thr	Gly
30	Lys	Ser	Ala 435	Ala	Leu	Arg	Ala	Ser 440	Arg	Ser	Lys	Thr	Thr 445	Leu	Asn	Gly
35	Ser 450	Leu	Ser	Phe	Thr	Asp	Pro 455	Tyr	Phe	Thr	Ala	Asp 460	Gly	Val	Ser	Leu
	Gly 465	Tyr	Asp	Val	Tyr	Gly 470	Lys	Ala	Phe	Asp	Pro 475	Arg	Lys	Ala	Ser	Thr 480
40	Ser	Ile	Lys	Gln	Tyr 485	Lys	Thr	Thr	Thr	Ala 490	Gly	Ala	Gly	Ile	Arg 495	Met
45	Ser	Val	Pro	Val 500	Thr	Glu	Tyr	Asp 505	Arg	Val	Asn	Phe	Gly 510	Leu	Val	Ala
	Glu	His	Leu	Thr 515	Val	Asn	Thr	Tyr 520	Asn	Lys	Ala	Pro 525	Lys	His	Tyr	Ala
50	Asp 530	Phe	Ile	Lys	Lys	Tyr	Gly 535	Lys	Thr	Asp	Gly 540	Thr	Asp	Gly	Ser	Phe
	Lys 545	Gly	Trp	Leu	Tyr	Lys	Gly 550	Thr	Val	Gly	Trp 555	Gly	Arg	Asn	Lys	Thr 560
55	Asp	Ser	Ala	Leu	Trp 565	Pro	Thr	Arg	Gly	Tyr 570	Leu	Thr	Gly	Val	Asn 575	Ala
60	Glu	Ile	Ala	Leu 580	Pro	Gly	Ser	Lys	Leu 585	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Ala 590	Thr	His
	Asn	Gln	Thr	Trp	Phe	Phe	Pro	Leu 600	Ser	Lys	Thr	Phe	Thr 605	Leu	Met	Leu
65	Gly 610	Gly	Glu	Val	Gly	Ile	Ala 615	Gly	Gly	Tyr	Gly	Arg 620	Thr	Lys	Glu	Ile

ES 2 507 100 T3

Pro Phe Phe Glu Asn Phe Tyr Gly Gly Gly Leu Gly Ser Val Arg Gly
 625 630 635 640
 5 Tyr Glu Ser Gly Thr Leu Gly Pro Lys Val Tyr Asp Glu Tyr Gly Glu
 645 650 655
 10 Lys Ile Ser Tyr Gly Gly Asn Lys Lys Ala Asn Val Ser Ala Glu Leu
 660 665 670
 15 Leu Phe Pro Met Pro Gly Ala Lys Asp Ala Arg Thr Val Arg Leu Ser
 675 680 685
 20 Leu Phe Ala Asp Ala Gly Ser Val Trp Asp Gly Lys Thr Tyr Asp Asp
 690 695 700
 25 Asn Ser Ser Ser Ala Thr Gly Gly Arg Val Gln Asn Ile Tyr Gly Ala
 705 710 715 720
 30 Gly Asn Thr His Lys Ser Thr Phe Thr Asn Glu Leu Arg Tyr Ser Ala
 725 730 735
 35 Gly Gly Ala Val Thr Trp Leu Ser Pro Leu Gly Pro Met Lys Phe Ser
 740 745 750
 40 Tyr Ala Tyr Pro Leu Lys Lys Lys Pro Glu Asp Glu Ile Gln Arg Phe
 755 760 765
 45 Gln Phe Gln Leu Gly Thr Thr Phe
 770 775

<210> 6

35 <211> 2379

<212> ADN

<213> Neisseria gonorrhoeae

<400> 6

40 atgaaactga aacagattgc ctccgcactg atgatgttgg gcatatcgcc tttggcattt 60
 gccgacttca ccatccaaga catccgtgtc gaaggcttgc agcgtaccga gccgagcacc 120
 gtattcaact acctgcccgt caaagtcggc gacacctaca acgacacaca cggcagtgcc 180
 atcatcaaaa gcctgtacgc caccggtttc tttgacgacg tacgagtcga aactgcggac 240
 45 gggcagcttc tgctgaccgt tatcgaacgc cccaccatcg gctcgtcaa catcaccggc 300
 gccaaaatgc tgcaaaacga cgccatcaag aaaaacctcg aatcgttcgg gctggcgag 360
 tcgcaatact ttaatcaggc gacactcaac caggcagtcg cggcctgaa agaagaatac 420
 ctcgggcgtg gcaaactcaa tatccaaatc acgccccaaag taaccaaact cgcccgaac 480
 cgcgtcgaca tcgacatcac gattgacgag ggcaaatccg ccaaaatcac cgacatcgaa 540
 50 tttgaaggca accaagtcta ttccgaccgc aaactgatgc ggcagatgct gctgaccgaa 600
 ggcggcattt ggacatggct gacacgaagc gaccggttcg accgccagaa attcgcccaa 660
 gacatgaaa aagtaaccga cttctaccag aacaacggct acttcgattt ccgtatcctc 720
 gataccgaca tccaaaccaa cgaagacaaa accaggcaga ccatcaaaat caccgtccac 780
 gaaggcggac gtttccgctg gggcaaagtg tcgattgaag gcgacaccaa cgaagtcccc 840
 55 aaggccgaac tggaaaaaact gctgaccatg aagccccgca aatggtacga acgcccagcag 900
 atgaccgcg ttttgggtga gattcagaac cgcattgggt cggcaggcta cgcatacagc 960
 gaaatcagcg tacagccgct gccgaacgcc ggaaccaaaa ccgtcgattt cgtcctgcac 1020
 atcgaaccgg gccggaaaat ctacgtcaac gaaatccaca tcaccggcaa caacaaaacc 1080
 cgcgacgaag tcgtgcgccg cgaattgctc caaatggaat ccgctcctta cgacacctcc 1140
 60 aagctgcaac gctccaaaga gcgcgtcgag cttttgggct acttcgacaa cgtacagttt 1200
 gatgccgtcc cgcttgccgg tacgcccgac aaagtgcgatt tgaacatgag cctgaccgaa 1260
 cgctccaccg gctcgtctga cttgagcgcg ggctgggttc aggataccgg cttgggtcatg 1320
 tccgcccggc tatcgcagga caacctgttc ggtacgggca agtcggccgc cctgcgcgcc 1380
 65 tcgcgaagca aaaccacgct caacggctcg ctgtcgttta ccgaccgta cttcacggca 1440

ES 2 507 100 T3

5 gacggggctca gcttgggcta cgatatttac ggaaaagcct tcgaccgcg caaagcatcg 1500
 accagcgtca aacaatataa aaccaccacc gccggcggcg gcgtaaggat gggatatccc 1560
 gttaccgaat acgaccgcgt caatttcggg ctggcggcgg aacacctgac cgtcaacacc 1620
 tacaacaaag cacccaaacg ctatgccgac tttatcagga aatacggcaa aaccgacggc 1680
 gcagacggca gcttcaaagg cctgctgtac aaaggcaccg tccgctgggg gcgcaacaag 1740
 accgacagcg cgtcatggcc gacgcgcggc tacctgaccg gcgtaaatgc cgaaatcgcc 1800
 ctgcccggca gcaactgca atactactcc gccaccacaca accaaacctg gttcttcccc 1860
 ttaagcaaaa ctttcacgct gatgctcggc ggcgaagtcg gcattgcggg cggctacggc 1920
 10 agaaccaaag aaatcccctt ctttgaaaaa ttctacggcg gcggcctggg ttcgggtgcgc 1980
 ggctacgaaa gcggcacgct cggcccgaag gtgtatgacg aatacggcga aaaaatcagc 2040
 tacggcggca acaaaaaagc caacgtctcc gccgagctgc tcttcccgat gcccggtgcg 2100
 aaagacgcac gcaccgtccg cctgagcctg tttgccgacg caggcagcgt gtgggacggc 2160
 agaacctata ccgccgccga aaacggtaac acaaatcggg tttactcgga aaacgcgcat 2220
 15 aaatccacct ttaccaacga attgcgctat tccgccggcg gcgcggttac ctggctctcg 2280
 cctttgggtc cgatgaaatt cagctacgcc taccgcgtga agaaaaaac ggaagacgaa 2340
 atccaacgct tccaattcca gctcggcagc acgttctaa 2379

<210> 7

<211> 792

20 <212> PRT

<213> Neisseria gonorrhoeae

<400> 7

25

Met Lys Leu Lys Gln Ile Ala Ser Ala Leu Met Met Leu Gly Ile Ser
 1 5 10 15

30

Pro Leu Ala Phe Ala Asp Phe Thr Ile Gln Asp Ile Arg Val Glu Gly
 20 25 30

Leu Gln Arg Thr Glu Pro Ser Thr Val Phe Asn Tyr Leu Pro Val Lys
 35 40 45

35

Val Gly Asp Thr Tyr Asn Asp Thr His Gly Ser Ala Ile Ile Lys Ser
 50 55 60

40

Leu Tyr Ala Thr Gly Phe Phe Asp Asp Val Arg Val Glu Thr Ala Asp
 65 70 75 80

Gly Gln Leu Leu Leu Thr Val Ile Glu Arg Pro Thr Ile Gly Ser Leu
 85 90 95

45

Asn Ile Thr Gly Ala Lys Met Leu Gln Asn Asp Ala Ile Lys Lys Asn
 100 105 110

Leu Glu Ser Phe Gly Leu Ala Gln Ser Gln Tyr Phe Asn Gln Ala Thr
 115 120 125

50

Leu Asn Gln Ala Val Ala Gly Leu Lys Glu Glu Tyr Leu Gly Arg Gly
 130 135 140

55

Lys Leu Asn Ile Gln Ile Thr Pro Lys Val Thr Lys Leu Ala Arg Asn
 145 150 155 160

Arg Val Asp Ile Asp Ile Thr Ile Asp Glu Gly Lys Ser Ala Lys Ile
 165 170 175

60

Thr Asp Ile Glu Phe Glu Gly Asn Gln Val Tyr Ser Asp Arg Lys Leu
 180 185 190

65

Met Arg Gln Met Ser Leu Thr Glu Gly Gly Ile Trp Thr Trp Leu Thr
 195 200 205

ES 2 507 100 T3

	Arg	Ser	Asp	Arg	Phe	Asp	Arg	Gln	Lys	Phe	Ala	Gln	Asp	Met	Glu	Lys
		210					215					220				
5	Val	Thr	Asp	Phe	Tyr	Gln	Asn	Asn	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe	Arg	Ile	Leu
	225					230					235					240
10	Asp	Thr	Asp	Ile	Gln	Thr	Asn	Glu	Asp	Lys	Thr	Arg	Gln	Thr	Ile	Lys
					245					250					255	
15	Ile	Thr	Val	His	Glu	Gly	Gly	Arg	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Val	Ser	Ile
				260					265					270		
20	Glu	Gly	Asp	Thr	Asn	Glu	Val	Pro	Lys	Ala	Glu	Leu	Glu	Lys	Leu	Leu
			275					280					285			
25	Thr	Met	Lys	Pro	Gly	Lys	Trp	Tyr	Glu	Arg	Gln	Gln	Met	Thr	Ala	Val
	290						295					300				
30	Leu	Gly	Glu	Ile	Gln	Asn	Arg	Met	Gly	Ser	Ala	Gly	Tyr	Ala	Tyr	Ser
	305					310					315					320
35	Glu	Ile	Ser	Val	Gln	Pro	Leu	Pro	Asn	Ala	Gly	Thr	Lys	Thr	Val	Asp
					325					330					335	
40	Phe	Val	Leu	His	Ile	Glu	Pro	Gly	Arg	Lys	Ile	Tyr	Val	Asn	Glu	Ile
				340					345					350		
45	His	Ile	Thr	Gly	Asn	Asn	Lys	Thr	Arg	Asp	Glu	Val	Val	Arg	Arg	Glu
			355					360					365			
50	Leu	Arg	Gln	Met	Glu	Ser	Ala	Pro	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Gln	Arg
	370						375					380				
55	Ser	Lys	Glu	Arg	Val	Glu	Leu	Leu	Gly	Tyr	Phe	Asp	Asn	Val	Gln	Phe
	385					390					395					400
60	Asp	Ala	Val	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Pro	Asp	Lys	Val	Asp	Leu	Asn	Met
					405					410					415	
65	Ser	Leu	Thr	Glu	Arg	Ser	Thr	Gly	Ser	Leu	Asp	Leu	Ser	Ala	Gly	Trp
				420					425					430		
70	Val	Gln	Asp	Thr	Gly	Leu	Val	Met	Ser	Ala	Gly	Val	Ser	Gln	Asp	Asn
			435					440					445			
75	Leu	Phe	Gly	Thr	Gly	Lys	Ser	Ala	Ala	Leu	Arg	Ala	Ser	Arg	Ser	Lys
	450						455					460				
80	Thr	Thr	Leu	Asn	Gly	Ser	Leu	Ser	Phe	Thr	Asp	Pro	Tyr	Phe	Thr	Ala
	465					470					475					480
85	Asp	Gly	Val	Ser	Leu	Gly	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Gly	Lys	Ala	Phe	Asp	Pro
					485					490					495	
90	Arg	Lys	Ala	Ser	Thr	Ser	Val	Lys	Gln	Tyr	Lys	Thr	Thr	Thr	Ala	Gly
				500					505						510	
95	Gly	Gly	Val	Arg	Met	Gly	Ile	Pro	Val	Thr	Glu	Tyr	Asp	Arg	Val	Asn
			515					520					525			

ES 2 507 100 T3

Phe Gly Leu Ala Ala Glu His Leu Thr Val Asn Thr Tyr Asn Lys Ala
 530 535 540
 5 Pro Lys Arg Tyr Ala Asp Phe Ile Arg Lys Tyr Gly Lys Thr Asp Gly
 545 550 555 560
 Ala Asp Gly Ser Phe Lys Gly Leu Leu Tyr Lys Gly Thr Val Gly Trp
 565 570 575
 10 Gly Arg Asn Lys Thr Asp Ser Ala Ser Trp Pro Thr Arg Gly Tyr Leu
 580 585 590
 Thr Gly Val Asn Ala Glu Ile Ala Leu Pro Gly Ser Lys Leu Gln Tyr
 595 600 605
 Tyr Ser Ala Thr His Asn Gln Thr Trp Phe Phe Pro Leu Ser Lys Thr
 610 615 620
 20 Phe Thr Leu Met Leu Gly Gly Glu Val Gly Ile Ala Gly Gly Tyr Gly
 625 630 635 640
 Arg Thr Lys Glu Ile Pro Phe Phe Glu Asn Phe Tyr Gly Gly Gly Leu
 645 650 655
 25 Gly Ser Val Arg Gly Tyr Glu Ser Gly Thr Leu Gly Pro Lys Val Tyr
 660 665 670
 30 Asp Glu Tyr Gly Glu Lys Ile Ser Tyr Gly Gly Asn Lys Lys Ala Asn
 675 680 685
 Val Ser Ala Glu Leu Leu Phe Pro Met Pro Gly Ala Lys Asp Ala Arg
 690 695 700
 35 Thr Val Arg Leu Ser Leu Phe Ala Asp Ala Gly Ser Val Trp Asp Gly
 705 710 715 720
 40 Arg Thr Tyr Thr Ala Ala Glu Asn Gly Asn Asn Lys Ser Val Tyr Ser
 725 730 735
 Glu Asn Ala His Lys Ser Thr Phe Thr Asn Glu Leu Arg Tyr Ser Ala
 740 745 750
 45 Gly Gly Ala Val Thr Trp Leu Ser Pro Leu Gly Pro Met Lys Phe Ser
 755 760 765
 50 Tyr Ala Tyr Pro Leu Lys Lys Lys Pro Glu Asp Glu Ile Gln Arg Phe
 770 775 780
 Gln Phe Gln Leu Gly Thr Thr Phe
 785 790
 55 <210> 8
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Neisseria gonorrhoeae
 60 <400> 8
 Met Lys Leu Lys Gln Ile Ala Ser Ala Leu Met Met Leu Gly Ile Ser
 1 5 10 15
 65 Pro Leu Ala Phe Ala

ES 2 507 100 T3

<210> 9
 <211> 771
 <212> PRT
 <213> Neisseria gonorrhoeae

5

<400> 9

10 Asp Phe Thr Ile Gln Asp Ile Arg Val Glu Gly Leu Gln Arg Thr Glu
 1 5 10 15

Pro Ser Thr Val Phe Asn Tyr Leu Pro Val Lys Val Gly Asp Thr Tyr
 20 25 30

15 Asn Asp Thr His Gly Ser Ala Ile Ile Lys Ser Leu Tyr Ala Thr Gly
 35 40 45

20 Phe Phe Asp Asp Val Arg Val Glu Thr Ala Asp Gly Gln Leu Leu Leu
 50 55 60

Thr Val Ile Glu Arg Pro Thr Ile Gly Ser Leu Asn Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80

25 Lys Met Leu Gln Asn Asp Ala Ile Lys Lys Asn Leu Glu Ser Phe Gly
 85 90 95

Leu Ala Gln Ser Gln Tyr Phe Asn Gln Ala Thr Leu Asn Gln Ala Val
 100 105 110

30 Ala Gly Leu Lys Glu Glu Tyr Leu Gly Arg Gly Lys Leu Asn Ile Gln
 115 120 125

35 Ile Thr Pro Lys Val Thr Lys Leu Ala Arg Asn Arg Val Asp Ile Asp
 130 135 140

Ile Thr Ile Asp Glu Gly Lys Ser Ala Lys Ile Thr Asp Ile Glu Phe
 145 150 155 160

40 Glu Gly Asn Gln Val Tyr Ser Asp Arg Lys Leu Met Arg Gln Met Ser
 165 170 175

45 Leu Thr Glu Gly Gly Ile Trp Thr Trp Leu Thr Arg Ser Asp Arg Phe
 180 185 190

Asp Arg Gln Lys Phe Ala Gln Asp Met Glu Lys Val Thr Asp Phe Tyr
 195 200 205

50 Gln Asn Asn Gly Tyr Phe Asp Phe Arg Ile Leu Asp Thr Asp Ile Gln
 210 215 220

55 Thr Asn Glu Asp Lys Thr Arg Gln Thr Ile Lys Ile Thr Val His Glu
 225 230 235 240

Gly Gly Arg Phe Arg Trp Gly Lys Val Ser Ile Glu Gly Asp Thr Asn
 245 250 255

60 Glu Val Pro Lys Ala Glu Leu Glu Lys Leu Leu Thr Met Lys Pro Gly
 260 265 270

65 Lys Trp Tyr Glu Arg Gln Gln Met Thr Ala Val Leu Gly Glu Ile Gln
 275 280 285

ES 2 507 100 T3

	Asn	Arg	Met	Gly	Ser	Ala	Gly	Tyr	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Ser	Val	Gln
	290						295					300				
5	Pro	Leu	Pro	Asn	Ala	Gly	Thr	Lys	Thr	Val	Asp	Phe	Val	Leu	His	Ile
	305					310					315					320
	Glu	Pro	Gly	Arg	Lys	Ile	Tyr	Val	Asn	Glu	Ile	His	Ile	Thr	Gly	Asn
					325					330					335	
10	Asn	Lys	Thr	Arg	Asp	Glu	Val	Val	Arg	Arg	Glu	Leu	Arg	Gln	Met	Glu
				340					345					350		
	Ser	Ala	Pro	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Gln	Arg	Ser	Lys	Glu	Arg	Val
15			355					360					365			
	Glu	Leu	Leu	Gly	Tyr	Phe	Asp	Asn	Val	Gln	Phe	Asp	Ala	Val	Pro	Leu
	370						375					380				
20	Ala	Gly	Thr	Pro	Asp	Lys	Val	Asp	Leu	Asn	Met	Ser	Leu	Thr	Glu	Arg
	385					390					395					400
	Ser	Thr	Gly	Ser	Leu	Asp	Leu	Ser	Ala	Gly	Trp	Val	Gln	Asp	Thr	Gly
25					405					410					415	
	Leu	Val	Met	Ser	Ala	Gly	Val	Ser	Gln	Asp	Asn	Leu	Phe	Gly	Thr	Gly
				420					425					430		
30	Lys	Ser	Ala	Ala	Leu	Arg	Ala	Ser	Arg	Ser	Lys	Thr	Thr	Leu	Asn	Gly
			435					440						445		
	Ser	Leu	Ser	Phe	Thr	Asp	Pro	Tyr	Phe	Thr	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Leu
35		450					455					460				
	Gly	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Gly	Lys	Ala	Phe	Asp	Pro	Arg	Lys	Ala	Ser	Thr
	465					470					475					480
40	Ser	Val	Lys	Gln	Tyr	Lys	Thr	Thr	Thr	Ala	Gly	Gly	Gly	Val	Arg	Met
					485					490					495	
	Gly	Ile	Pro	Val	Thr	Glu	Tyr	Asp	Arg	Val	Asn	Phe	Gly	Leu	Ala	Ala
				500					505					510		
45	Glu	His	Leu	Thr	Val	Asn	Thr	Tyr	Asn	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Tyr	Ala
			515					520					525			
	Asp	Phe	Ile	Arg	Lys	Tyr	Gly	Lys	Thr	Asp	Gly	Ala	Asp	Gly	Ser	Phe
50		530					535					540				
	Lys	Gly	Leu	Leu	Tyr	Lys	Gly	Thr	Val	Gly	Trp	Gly	Arg	Asn	Lys	Thr
	545					550					555					560
55	Asp	Ser	Ala	Ser	Trp	Pro	Thr	Arg	Gly	Tyr	Leu	Thr	Gly	Val	Asn	Ala
					565					570					575	
	Glu	Ile	Ala	Leu	Pro	Gly	Ser	Lys	Leu	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Thr	His
60				580					585					590		
	Asn	Gln	Thr	Trp	Phe	Phe	Pro	Leu	Ser	Lys	Thr	Phe	Thr	Leu	Met	Leu
			595					600						605		
65																

ES 2 507 100 T3

Gly Gly Glu Val Gly Ile Ala Gly Gly Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Ile
 610 615 620
 5 Pro Phe Phe Glu Asn Phe Tyr Gly Gly Gly Leu Gly Ser Val Arg Gly
 625 630 635
 Tyr Glu Ser Gly Thr Leu Gly Pro Lys Val Tyr Asp Glu Tyr Gly Glu
 645 650 655
 10 Lys Ile Ser Tyr Gly Gly Asn Lys Lys Ala Asn Val Ser Ala Glu Leu
 660 665 670
 Leu Phe Pro Met Pro Gly Ala Lys Asp Ala Arg Thr Val Arg Leu Ser
 675 680 685
 15 Leu Phe Ala Asp Ala Gly Ser Val Trp Asp Gly Arg Thr Tyr Thr Ala
 690 695 700
 Ala Glu Asn Gly Asn Asn Lys Ser Val Tyr Ser Glu Asn Ala His Lys
 705 710 715 720
 20 Ser Thr Phe Thr Asn Glu Leu Arg Tyr Ser Ala Gly Gly Ala Val Thr
 725 730 735
 Trp Leu Ser Pro Leu Gly Pro Met Lys Phe Ser Tyr Ala Tyr Pro Leu
 740 745 750
 25 Lys Lys Lys Pro Glu Asp Glu Ile Gln Arg Phe Gln Phe Gln Leu Gly
 755 760 765
 30 Thr Thr Phe
 770

<210> 10
 <211> 2394
 <212> ADN
 35 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 10

40 atgaaactga aacagattgc ttccgcactg atgggtcttg gcatatcgcc tttggcactt 60
 gccgacttca ccatccaaga catccgcgct gaaggcttgc agcgtaccga gccgagtacc 120
 gtattcaact acctgcccgct caaagtcggc gacacctaca acgacacaca cggcagtgcc 180
 atcatcaaaa gcctgtacgc caccggtttc tttgacgacg tacgcgtcga aactgcggaac 240
 gggcagctcc tgctgaccgt tatcgaacgc cccaccatcg gctcgtctca catcaccggc 300
 45 gcaaaaatgc tgcaaaacga cgccattaag aaaaacctcg aatcgttcgg gctggcgcag 360
 tcgcaatact ttaatcaggc gacactcaat caggcagtcg ccggcctgaa agaagaatac 420
 ctcgggcgcg gcaaaactcaa tatccaaatc acgccccaaag taaccaaaact cgcccgcaac 480
 cgcgctcgaca tcgacatcac gattgacgag ggcaaatccg ccaaaatcac cgacatcgaa 540
 tttgaaggca accaagtcta ttccgaccgc aaactgatgc ggcagatgct gctgaccgaa 600
 50 ggcggcattt ggacatggct gacacgaagc aaccaattca acgagcagaa atttgcccaa 660
 gacatggaaa aagtaaccga cttctaccag aacaacggct acttcgattt ccgcatcctc 720
 gataccgaca tccaaaccaa cgaagacaaa accaagcaga ccatcaaaat caccgtccac 780
 gaaggcggac gtttccggtg gggcaaaagtc tccatcgaag gcgacaccaa cgaagtcccc 840
 aaagccgaac tggaaaaact gctgaccatg aagcccggca aatggtacga acgcccagcag 900
 55 atgaccgccc ttttgggtga gattcagaac cgcatgggct cggcaggcta cgcatacagc 960
 gaaatcagcg tacagccgct gccaaacgcc gaaaccaaaa ccgctcgattt cgtcctgcac 1020
 atcgaaccgg gccggaaaat ctacgtcaac gaaatccaca tcaccggcaa caacaaaacc 1080
 cgcgacgaag tcgtgcgccg cgaattgcgc caaatggaat ccgcgcctta cgacacctcc 1140
 aagctgcaac gctccaaaga cgcgctcgag cttttgggct acttcgacaa cgtacagttt 1200
 60 gatgccgtcc cgcttgccgg cacaccgac aaagtcgatt tgaacatgag cctgaccgaa 1260
 cgttccaccg gctcgcctcga cttgagcgcg ggctgggtac aggataccgg cctggtcatg 1320

65

ES 2 507 100 T3

5 tccgcaggcg tttccaaga caacctgttc ggtacgggca agtcggccgc cctgcgcgcc 1380
 tcacgaagca aaaccacgct caacggctcg ctgtcgttta cgcaccgta cttcacggca 1440
 gacggggta gcttgggcta cgatgtttac ggaaaagcct tcgaccgcg caaagcatcg 1500
 accagcatca aacaataaa aaccaccag gcagggcag gcacccgat gagcgtgcct 1560
 gttaccgaat acgaccgct gaatttcggt ttggtggcag aacacctgac cgtcaacacc 1620
 tacaacaaag cgcccaaca ctatgcccac tttatcaaga aatacggcaa aaccgacggc 1680
 acagacggca gcttcaaagg ctggctgtac aaaggtaccg tcggctgggg gcgcaacaaa 1740
 accgacagcg cgttatggcc gacgcgcggc tacctgacgg gcgtgaacgc cgaatcggcc 1800
 ctgcccggca gcaaactgca atactactcc gccaccaca accaaacctg gttcttccc 1860
 10 ttaagcaaaa cttcacgct gatgctcggc ggcgaagtcg gcattgcggg cggctacggc 1920
 agaaccaaa aaatcccctt ctttgaaaac ttctacggcg gcggcctggg ttcggtgccc 1980
 ggatagcaa gcggcagcgt cggtcgaaa gtgtatgac aatacggcga aaaaatcagc 2040
 tacggcggca acaaaaaagc caacgtctcc gccgagctgc tcttccgat gccggcgcg 2100
 aaagacggcg gcaccgtccg cctgagcctg tttgccagc caggcagcgt gtgggacggc 2160
 aaaacctacg acgacaacag cagttcccg accggcgca gggttcaaaa catttacggc 2220
 15 gccggcaata cccataaatc cacctttacc aacgaattgc gctattccgc cggcggcgcg 2280
 gttacctggc tctcgccttt aggccgatg aaattcagct acgcctacc gctgaagaaa 2340
 aaaccggaag acgaaatcca acgcttccaa ttccaactcg gcacgacgct ctaa 2394

20 <210> 11
 <211> 797
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 25 <400> 11

30 Met Lys Leu Lys Gln Ile Ala Ser Ala Leu Met Val Leu Gly Ile Ser
 1 5 10 15
 Pro Leu Ala Leu Ala Asp Phe Thr Ile Gln Asp Ile Arg Val Glu Gly
 20 25 30
 35 Leu Gln Arg Thr Glu Pro Ser Thr Val Phe Asn Tyr Leu Pro Val Lys
 35 40 45
 Val Gly Asp Thr Tyr Asn Asp Thr His Gly Ser Ala Ile Ile Lys Ser
 50 55 60
 40 Leu Tyr Ala Thr Gly Phe Phe Asp Asp Val Arg Val Glu Thr Ala Asp
 65 70 75 80
 Gly Gln Leu Leu Leu Thr Val Ile Glu Arg Pro Thr Ile Gly Ser Leu
 85 90 95
 45 Asn Ile Thr Gly Ala Lys Met Leu Gln Asn Asp Ala Ile Lys Lys Asn
 100 105 110
 50 Leu Glu Ser Phe Gly Leu Ala Gln Ser Gln Tyr Phe Asn Gln Ala Thr
 115 120 125
 Leu Asn Gln Ala Val Ala Gly Leu Lys Glu Glu Tyr Leu Gly Arg Gly
 130 135 140
 55 Lys Leu Asn Ile Gln Ile Thr Pro Lys Val Thr Lys Leu Ala Arg Asn
 145 150 155 160
 60 Arg Val Asp Ile Asp Ile Thr Ile Asp Glu Gly Lys Ser Ala Lys Ile
 165 170 175
 Thr Asp Ile Glu Phe Glu Gly Asn Gln Val Tyr Ser Asp Arg Lys Leu
 180 185 190

ES 2 507 100 T3

	Met	Arg	Gln	Met	Ser	Leu	Thr	Glu	Gly	Gly	Ile	Trp	Thr	Trp	Leu	Thr
			195					200					205			
5	Arg	Ser	Asn	Gln	Phe	Asn	Glu	Gln	Lys	Phe	Ala	Gln	Asp	Met	Glu	Lys
	210						215					220				
10	Val	Thr	Asp	Phe	Tyr	Gln	Asn	Asn	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe	Arg	Ile	Leu
	225					230					235					240
	Asp	Thr	Asp	Ile	Gln	Thr	Asn	Glu	Asp	Lys	Thr	Lys	Gln	Thr	Ile	Lys
				245						250					255	
15	Ile	Thr	Val	His	Glu	Gly	Gly	Arg	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Val	Ser	Ile
				260					265					270		
20	Glu	Gly	Asp	Thr	Asn	Glu	Val	Pro	Lys	Ala	Glu	Leu	Glu	Lys	Leu	Leu
			275					280					285			
	Thr	Met	Lys	Pro	Gly	Lys	Trp	Tyr	Glu	Arg	Gln	Gln	Met	Thr	Ala	Val
		290					295					300				
25	Leu	Gly	Glu	Ile	Gln	Asn	Arg	Met	Gly	Ser	Ala	Gly	Tyr	Ala	Tyr	Ser
	305					310					315					320
	Glu	Ile	Ser	Val	Gln	Pro	Leu	Pro	Asn	Ala	Glu	Thr	Lys	Thr	Val	Asp
					325					330					335	
30	Phe	Val	Leu	His	Ile	Glu	Pro	Gly	Arg	Lys	Ile	Tyr	Val	Asn	Glu	Ile
				340					345					350		
35	His	Ile	Thr	Gly	Asn	Asn	Lys	Thr	Arg	Asp	Glu	Val	Val	Arg	Arg	Glu
			355					360					365			
	Leu	Arg	Gln	Met	Glu	Ser	Ala	Pro	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Gln	Arg
		370					375					380				
40	Ser	Lys	Glu	Arg	Val	Glu	Leu	Leu	Gly	Tyr	Phe	Asp	Asn	Val	Gln	Phe
	385					390					395					400
	Asp	Ala	Val	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Pro	Asp	Lys	Val	Asp	Leu	Asn	Met
45				405						410					415	
	Ser	Leu	Thr	Glu	Arg	Ser	Thr	Gly	Ser	Leu	Asp	Leu	Ser	Ala	Gly	Trp
			420						425					430		
50	Val	Gln	Asp	Thr	Gly	Leu	Val	Met	Ser	Ala	Gly	Val	Ser	Gln	Asp	Asn
			435					440					445			
	Leu	Phe	Gly	Thr	Gly	Lys	Ser	Ala	Ala	Leu	Arg	Ala	Ser	Arg	Ser	Lys
55		450					455					460				
	Thr	Thr	Leu	Asn	Gly	Ser	Leu	Ser	Phe	Thr	Asp	Pro	Tyr	Phe	Thr	Ala
	465				470						475					480
60	Asp	Gly	Val	Ser	Leu	Gly	Tyr	Asp	Val	Tyr	Gly	Lys	Ala	Phe	Asp	Pro
					485					490					495	
	Arg	Lys	Ala	Ser	Thr	Ser	Ile	Lys	Gln	Tyr	Lys	Thr	Thr	Thr	Ala	Gly
				500					505					510		
65	Ala	Gly	Ile	Arg	Met	Ser	Val	Pro	Val	Thr	Glu	Tyr	Asp	Arg	Val	Asn

ES 2 507 100 T3

	515		520		525														
	Phe	Gly	Leu	Val	Ala	Glu	His	Leu	Thr	Val	Asn	Thr	Tyr	Asn	Lys	Ala			
	530						535					540							
5	Pro	Lys	His	Tyr	Ala	Asp	Phe	Ile	Lys	Lys	Tyr	Gly	Lys	Thr	Asp	Gly			
	545					550					555					560			
	Thr	Asp	Gly	Ser	Phe	Lys	Gly	Trp	Leu	Tyr	Lys	Gly	Thr	Val	Gly	Trp			
10					565					570					575				
	Gly	Arg	Asn	Lys	Thr	Asp	Ser	Ala	Leu	Trp	Pro	Thr	Arg	Gly	Tyr	Leu			
				580					585					590					
15	Thr	Gly	Val	Asn	Ala	Glu	Ile	Ala	Leu	Pro	Gly	Ser	Lys	Leu	Gln	Tyr			
			595					600					605						
	Tyr	Ser	Ala	Thr	His	Asn	Gln	Thr	Trp	Phe	Phe	Pro	Leu	Ser	Lys	Thr			
	610						615					620							
20	Phe	Thr	Leu	Met	Leu	Gly	Gly	Glu	Val	Gly	Ile	Ala	Gly	Gly	Tyr	Gly			
	625					630					635					640			
	Arg	Thr	Lys	Glu	Ile	Pro	Phe	Phe	Glu	Asn	Phe	Tyr	Gly	Gly	Gly	Leu			
25					645					650					655				
	Gly	Ser	Val	Arg	Gly	Tyr	Glu	Ser	Gly	Thr	Leu	Gly	Pro	Lys	Val	Tyr			
				660					665					670					
30	Asp	Glu	Tyr	Gly	Glu	Lys	Ile	Ser	Tyr	Gly	Gly	Asn	Lys	Lys	Ala	Asn			
			675					680					685						
	Val	Ser	Ala	Glu	Leu	Leu	Phe	Pro	Met	Pro	Gly	Ala	Lys	Asp	Ala	Arg			
	690						695					700							
35	Thr	Val	Arg	Leu	Ser	Leu	Phe	Ala	Asp	Ala	Gly	Ser	Val	Trp	Asp	Gly			
	705					710					715				720				
	Lys	Thr	Tyr	Asp	Asp	Asn	Ser	Ser	Ser	Ala	Thr	Gly	Gly	Arg	Val	Gln			
40					725					730					735				
	Asn	Ile	Tyr	Gly	Ala	Gly	Asn	Thr	His	Lys	Ser	Thr	Phe	Thr	Asn	Glu			
				740					745					750					
45	Leu	Arg	Tyr	Ser	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	Thr	Trp	Leu	Ser	Pro	Leu	Gly			
			755					760					765						
	Pro	Met	Lys	Phe	Ser	Tyr	Ala	Tyr	Pro	Leu	Lys	Lys	Lys	Pro	Glu	Asp			
	770						775					780							
50	Glu	Ile	Gln	Arg	Phe	Gln	Phe	Gln	Leu	Gly	Thr	Thr	Phe						
	785					790					795								
55	<210>	12																	
	<211>	21																	
	<212>	PRT																	
	<213>	Neisseria meningitidis																	
60	<400>	12																	
	Met	Lys	Leu	Lys	Gln	Ile	Ala	Ser	Ala	Leu	Met	Val	Leu	Gly	Ile	Ser			
	1				5					10					15				

Pro Leu Ala Leu Ala
20

<210> 13
<211> 776
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis

<400> 13

5
10 Asp Phe Thr Ile Gln Asp Ile Arg Val Glu Gly Leu Gln Arg Thr Glu
1 5 10 15
15 Pro Ser Thr Val Phe Asn Tyr Leu Pro Val Lys Val Gly Asp Thr Tyr
20 25 30
20 Asn Asp Thr His Gly Ser Ala Ile Ile Lys Ser Leu Tyr Ala Thr Gly
35 40 45
20 Phe Phe Asp Asp Val Arg Val Glu Thr Ala Asp Gly Gln Leu Leu Leu
50 55 60
25 Thr Val Ile Glu Arg Pro Thr Ile Gly Ser Leu Asn Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80
30 Lys Met Leu Gln Asn Asp Ala Ile Lys Lys Asn Leu Glu Ser Phe Gly
85 90 95
30 Leu Ala Gln Ser Gln Tyr Phe Asn Gln Ala Thr Leu Asn Gln Ala Val
100 105 110
35 Ala Gly Leu Lys Glu Glu Tyr Leu Gly Arg Gly Lys Leu Asn Ile Gln
115 120 125
40 Ile Thr Pro Lys Val Thr Lys Leu Ala Arg Asn Arg Val Asp Ile Asp
130 135 140
40 Ile Thr Ile Asp Glu Gly Lys Ser Ala Lys Ile Thr Asp Ile Glu Phe
145 150 155 160
45 Glu Gly Asn Gln Val Tyr Ser Asp Arg Lys Leu Met Arg Gln Met Ser
165 170 175
50 Leu Thr Glu Gly Gly Ile Trp Thr Trp Leu Thr Arg Ser Asn Gln Phe
180 185 190
50 Asn Glu Gln Lys Phe Ala Gln Asp Met Glu Lys Val Thr Asp Phe Tyr
195 200 205
55 Gln Asn Asn Gly Tyr Phe Asp Phe Arg Ile Leu Asp Thr Asp Ile Gln
210 215 220
60 Thr Asn Glu Asp Lys Thr Lys Gln Thr Ile Lys Ile Thr Val His Glu
225 230 235 240
60 Gly Gly Arg Phe Arg Trp Gly Lys Val Ser Ile Glu Gly Asp Thr Asn
245 250 255
65 Glu Val Pro Lys Ala Glu Leu Glu Lys Leu Leu Thr Met Lys Pro Gly
260 265 270

ES 2 507 100 T3

Lys Trp Tyr Glu Arg Gln Gln Met Thr Ala Val Leu Gly Glu Ile Gln
 275 280 285
 5 Asn Arg Met Gly Ser Ala Gly Tyr Ala Tyr Ser Glu Ile Ser Val Gln
 290 295 300
 Pro Leu Pro Asn Ala Glu Thr Lys Thr Val Asp Phe Val Leu His Ile
 305 310 315 320
 10 Glu Pro Gly Arg Lys Ile Tyr Val Asn Glu Ile His Ile Thr Gly Asn
 325 330 335
 Asn Lys Thr Arg Asp Glu Val Val Arg Arg Glu Leu Arg Gln Met Glu
 340 345 350
 15 Ser Ala Pro Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Gln Arg Ser Lys Glu Arg Val
 355 360
 Glu Leu Leu Gly Tyr Phe Asp Asn Val Gln Phe Asp Ala Val Pro Leu
 370 375 380
 20 Ala Gly Thr Pro Asp Lys Val Asp Leu Asn Met Ser Leu Thr Glu Arg
 385 390 395 400
 25 Ser Thr Gly Ser Leu Asp Leu Ser Ala Gly Trp Val Gln Asp Thr Gly
 405 410 415
 Leu Val Met Ser Ala Gly Val Ser Gln Asp Asn Leu Phe Gly Thr Gly
 420 425 430
 30 Lys Ser Ala Ala Leu Arg Ala Ser Arg Ser Lys Thr Thr Leu Asn Gly
 435 440 445
 Ser Leu Ser Phe Thr Asp Pro Tyr Phe Thr Ala Asp Gly Val Ser Leu
 450 455 460
 35 Gly Tyr Asp Val Tyr Gly Lys Ala Phe Asp Pro Arg Lys Ala Ser Thr
 465 470 475 480
 40 Ser Ile Lys Gln Tyr Lys Thr Thr Thr Ala Gly Ala Gly Ile Arg Met
 485 490 495
 Ser Val Pro Val Thr Glu Tyr Asp Arg Val Asn Phe Gly Leu Val Ala
 500 505 510
 45 Glu His Leu Thr Val Asn Thr Tyr Asn Lys Ala Pro Lys His Tyr Ala
 515 520 525
 50 Asp Phe Ile Lys Lys Tyr Gly Lys Thr Asp Gly Thr Asp Gly Ser Phe
 530 535 540
 Lys Gly Trp Leu Tyr Lys Gly Thr Val Gly Trp Gly Arg Asn Lys Thr
 545 550 555 560
 55 Asp Ser Ala Leu Trp Pro Thr Arg Gly Tyr Leu Thr Gly Val Asn Ala
 565 570 575
 60 Glu Ile Ala Leu Pro Gly Ser Lys Leu Gln Tyr Tyr Ser Ala Thr His
 580 585 590
 Asn Gln Thr Trp Phe Phe Pro Leu Ser Lys Thr Phe Thr Leu Met Leu

65

ES 2 507 100 T3

		595				600					605						
		Gly	Gly	Glu	Val	Gly	Ile	Ala	Gly	Gly	Tyr	Gly	Arg	Thr	Lys	Glu	Ile
		610						615				620					
5		Pro	Phe	Phe	Glu	Asn	Phe	Tyr	Gly	Gly	Gly	Leu	Gly	Ser	Val	Arg	Gly
		625					630					635					640
10		Tyr	Glu	Ser	Gly	Thr	Leu	Gly	Pro	Lys	Val	Tyr	Asp	Glu	Tyr	Gly	Glu
						645					650					655	
		Lys	Ile	Ser	Tyr	Gly	Gly	Asn	Lys	Lys	Ala	Asn	Val	Ser	Ala	Glu	Leu
					660					665					670		
15		Leu	Phe	Pro	Met	Pro	Gly	Ala	Lys	Asp	Ala	Arg	Thr	Val	Arg	Leu	Ser
				675					680					685			
20		Leu	Phe	Ala	Asp	Ala	Gly	Ser	Val	Trp	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Asp	Asp
		690						695					700				
		Asn	Ser	Ser	Ser	Ala	Thr	Gly	Gly	Arg	Val	Gln	Asn	Ile	Tyr	Gly	Ala
		705					710					715				720	
25		Gly	Asn	Thr	His	Lys	Ser	Thr	Phe	Thr	Asn	Glu	Leu	Arg	Tyr	Ser	Ala
						725					730					735	
		Gly	Gly	Ala	Val	Thr	Trp	Leu	Ser	Pro	Leu	Gly	Pro	Met	Lys	Phe	Ser
					740					745					750		
30		Tyr	Ala	Tyr	Pro	Leu	Lys	Lys	Lys	Pro	Glu	Asp	Glu	Ile	Gln	Arg	Phe
				755					760					765			
35		Gln	Phe	Gln	Leu	Gly	Thr	Thr	Phe								
		770						775									
		<210>	14														
		<211>	441														
		<212>	PRT														
		<213>	Neisseria meningitidis														
40		<400>	14														
		Met	Lys	Lys	Tyr	Leu	Phe	Arg	Ala	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ile	Ala	Ala	Ala
		1				5					10					15	
45		Ile	Leu	Ala	Ala	Cys	Gln	Ser	Lys	Ser	Ile	Gln	Thr	Phe	Pro	Gln	Pro
				20						25					30		
50		Asp	Thr	Ser	Val	Ile	Asn	Gly	Pro	Asp	Arg	Pro	Val	Gly	Ile	Pro	Asp
				35					40					45			
		Pro	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Val	Tyr	Thr	Val	Val
		50						55					60				
55		Pro	His	Leu	Ser	Leu	Pro	His	Trp	Ala	Ala	Gln	Asp	Phe	Ala	Lys	Ser
		65					70					75				80	
60		Leu	Gln	Ser	Phe	Arg	Leu	Gly	Cys	Ala	Asn	Leu	Lys	Asn	Arg	Gln	Gly
						85					90					95	
		Trp	Gln	Asp	Val	Cys	Ala	Gln	Ala	Phe	Gln	Thr	Pro	Val	His	Ser	Phe
					100					105					110		

ES 2 507 100 T3

Gln Ala Lys Gln Phe Phe Glu Arg Tyr Phe Thr Pro Trp Gln Val Ala
 115 120 125
 5 Gly Asn Gly Ser Leu Ala Gly Thr Val Thr Gly Tyr Tyr Glu Pro Val
 130 135 140
 Leu Lys Gly Asp Asp Arg Arg Thr Ala Gln Ala Arg Phe Pro Ile Tyr
 145 150 155 160
 10 Gly Ile Pro Asp Asp Phe Ile Ser Val Pro Leu Pro Ala Gly Leu Arg
 165 170 175
 Ser Gly Lys Ala Leu Val Arg Ile Arg Gln Thr Gly Lys Asn Ser Gly
 180 185 190
 15 Thr Ile Asp Asn Thr Gly Gly Thr His Thr Ala Asp Leu Ser Arg Phe
 195 200 205
 Pro Ile Thr Ala Arg Thr Thr Ala Ile Lys Gly Arg Phe Glu Gly Ser
 210 215 220
 20 Arg Phe Leu Pro Tyr His Thr Arg Asn Gln Ile Asn Gly Gly Ala Leu
 225 230 235 240
 25 Asp Gly Lys Ala Pro Ile Leu Gly Tyr Ala Glu Asp Pro Val Glu Leu
 245 250 255
 Phe Phe Met His Ile Gln Gly Ser Gly Arg Leu Lys Thr Pro Ser Gly
 260 265 270
 30 Lys Tyr Ile Arg Ile Gly Tyr Ala Asp Lys Asn Glu His Pro Tyr Val
 275 280 285
 Ser Ile Gly Arg Tyr Met Ala Asp Lys Gly Tyr Leu Lys Leu Gly Gln
 290 295 300
 35 Thr Ser Met Gln Gly Ile Lys Ala Tyr Met Arg Gln Asn Pro Gln Arg
 305 310 315 320
 40 Leu Ala Glu Val Leu Gly Gln Asn Pro Ser Tyr Ile Phe Phe Arg Glu
 325 330 335
 Leu Ala Gly Ser Ser Asn Asp Gly Pro Val Gly Ala Leu Gly Thr Pro
 340 345 350
 45 Leu Met Gly Glu Tyr Ala Gly Ala Val Asp Arg His Tyr Ile Thr Leu
 355 360 365
 Gly Ala Pro Leu Phe Val Ala Thr Ala His Pro Val Thr Arg Lys Ala
 370 375 380
 50 Leu Asn Arg Leu Ile Met Ala Gln Asp Thr Gly Ser Ala Ile Lys Gly
 385 390 395 400
 Ala Val Arg Val Asp Tyr Phe Trp Gly Tyr Gly Asp Glu Ala Gly Glu
 405 410 415
 Leu Ala Gly Lys Gln Lys Thr Thr Gly Tyr Val Trp Gln Leu Leu Pro
 420 425 430
 60 Asn Gly Met Lys Pro Glu Tyr Arg Pro
 435 440
 65

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende (a) una preparación de membrana externa del serogrupo B de *N. meningitidis*, y (b) un componente inmunogénico que comprende una proteína que comprende (i) una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente de las SEQ IDs:

2534 VNRTTFCCLSLTAGPDSRLQRRGGGGVVAADIGTGLADALTAPLDHKD
KGLKSLTLEASIPQNGTLTLAQAQGAEKTFKAGGKDNSLNTGKLNKNDKISRDFV
QKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSVVVALRIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSDLG
GEHTAFNQLPDGKAHEYHGKAFSSDDADGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQ
NVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYRLALFGDRAQEIAGSATVKIG
EKVHEIGIADKQ ,

2536 VNRTAFCCSLTTALILTACSSGGGGVVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGL
QSLTLDQSVRKNEKLLAAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKNDKVSRLFDFIRQIEV
DGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMOVAKRQFRIGDIAGEHT
SFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNKIEHLKSPELNVDL
AAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAQEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIR
HIGLAAKQ ,

y

2538 VNRTAFCCSLTAALILTACSSGGGGVVAADIGAVLADALTAPLDHKDK
SLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKNDKVSRLFDFIRQIE
VDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMOVAKRQFRIGDIAGE
HTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDASGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNV
DLAASDIKPKKRHAVISGSVLYNQAQEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANG
IRHIGLAAKQ

como se describe en la WO99/57280, (ii) un fragmento inmunogénico de una o más de las mencionadas SEQ IDs 2534, 2536 y 2538 o (iii) una secuencia de aminoácidos que tiene más de un 80% de identidad de secuencia con una de las mencionadas SEQ IDs 2534, 2536 y 2538.

2. La composición de la reivindicación 1, en donde el componente (b) es una proteína Nmb.

3. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el componente (b) incluye una proteína de una cepa de Nmb diferente de la que se deriva el componente (a).

4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde uno o más de sus componentes es adsorbido en hidróxido de aluminio.

5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el componente (a) comprende OMVs.

6. La composición de la reivindicación 5, en donde las OMVs son extracto de desoxicolato de NmB.

7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el componente (a) es adsorbido en un hidróxido de aluminio.

8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además uno o más de los siguientes componentes:

- 5 • un antígeno protector contra el serogrupo A de la Neisseria meningitidis;
- un antígeno protector contra el serogrupo C de la Neisseria meningitidis;
- un antígeno protector contra el serogrupo Y de la Neisseria meningitidis;
- un antígeno protector contra el serogrupo W de la Neisseria meningitidis;
- 10 • un antígeno protector contra la Haemophilus influenzae;
- un antígeno protector contra neumococos;
- un antígeno protector contra difteria;
- un antígeno protector contra el tétano;
- un antígeno protector contra la tosferina;
- 15 • un antígeno protector contra Helicobacter pylori;
- un antígeno protector contra la polio; y/o
- un antígeno protector contra el virus de la hepatitis B.

9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la composición es para su uso como una vacuna.

20

10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso como un medicamento.

11. El uso de la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la fabricación de

- 25 (i) un medicamento para tratar o prevenir la infección debida a bacterias de Neisseria; (ii) un reactivo de diagnóstico para detectar la presencia de bacterias de Neisseria o de anticuerpos promovidos contra bacterias de Neisseria; y/o (iii) un reactivo que puede promover anticuerpos contra las bacterias de Neisseria.

12. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en tratar o prevenir la infección debida a bacterias de Neisseria.

30

13. Una composición que comprende una preparación de la membrana externa del serogrupo B de la Neisseria meningitidis y una proteína como se define en la reivindicación 1, preparada de una bacteria que ha sido manipulada para hiperproducir la proteína en su membrana externa.

35

14. Una preparación de membrana externa bacteriana del serogrupo B de la Neisseria meningitidis (NmB) que comprende un componente inmunogénico que comprende una proteína que comprende (i) una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente de las SEQ IDs:

40

2534, VNRTTFCCLSLTAGPDSRLQRRGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHK

DKGLKSLTLEASIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGGKDNSLNTGKLKNDKISRFD

45

VQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSVVVALRIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSDL

GGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDADGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPE

QNVELASAELKADEKSHA VILGDTRYGGEEKGTYRLALFGDRAQEIAGSATVKI

50

GEKVHEIGIADKQ ,

55

60

65

2536, VNRTAFCCLSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGL
QSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEV
5 DGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHT
SFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDL
10 AAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIR
HIGLAAKQ ,

y

2538, VNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAVLADALTAPLDHKDKSL
QSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEV
20 DGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQVQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEH
TSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDASGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVD
25 LAASDIKPKKRHAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVETANGI
RHIGLAAKQ,

30 como se describe en la WO099/57280, (ii) un fragmento inmunogénico de una o más de las mencionadas SEQ IDs
2534, 2536 y 2538, o (iii) una secuencia de aminoácidos que tiene más del 80% de identidad de secuencia con una
de las mencionadas SEQ IDs 2534, 2536 y 2538.

35

40

45

50

55

60

65