

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 575**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/31** (2006.01)  
**C07K 14/22** (2006.01)  
**C07K 16/12** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**A61K 39/095** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.1999 E 08003373 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 1944371**

54 Título: **Antígenos y composiciones de neisseria meningitidis**

30 Prioridad:

**01.05.1998 US 83758 P 31.07.1998 US 94869 P**  
**02.09.1998 US 98994 P 02.09.1998 US 99062 P**  
**09.10.1998 US 103749 P 09.10.1998 US 103794 P**  
**09.10.1998 US 103796 P 25.02.1999 US 121528 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.06.2015**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (50.0%)**  
**Lichtstrasse 35**  
**4056 Basel , CH y**  
**J. CRAIG VENTER INSTITUTE, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FRASER, CLAIRE;**  
**GALEOTTI, CESIRA;**  
**GRANDI, GUIDO;**  
**HICKEY, ERIN;**  
**MASIGNANI, VEGA;**  
**MORA, MARIAROSA;**  
**PETERSEN, JEREMY;**  
**PIZZA, MARIAGRATIA;**  
**RAPPUOLI, RINO;**  
**RATTI, GIULIO;**  
**SCALATO, ENZO;**  
**SCARSELLI, MARIA;**  
**TETTELIN, HERVÉ y**  
**VENTER, J. CRAIG**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 537 575 T3**

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

**Antígenos y composiciones de neisseria meningitidis****Descripción**

5 Esta invención se refiere a antígenos de las especies bacterianas: *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae*.

**ANTECEDENTES**

10 *Neisseria meningitidis* es un diplococo gram negativo inmóvil patógeno del ser humano. Coloniza la faringe, causando meningitis y ocasionalmente septicemia en ausencia de meningitis. Está estrechamente relacionado con *N. gonorrhoeae*, aunque una característica que diferencia claramente los meningococos de gonococos es la presencia de una cápsula de polisacáridos que está presente en todos los meningococos patógenos.

15 *N. meningitidis* causa enfermedad endémica y epidémica. En los Estados Unidos el índice de infección es de 0,6-1 por cada 100.000 personas al año, y puede ser mucho mayor durante los brotes (véase Lieberman y col., (1996) Safety and Immunogenicity of a Serogroups A/C *Neisseria meningitidis* Oligosaccharide-Protein Conjugate Vaccine in Young Children. JAMA 275(19): 1499-1503; Schuchat y col., (1997) Bacterial Meningitis in the United States in 1995. N Engl J Med 337(14): 970-976). En los países en vías de desarrollo, los índices de enfermedad endémica son mucho mayores y durante los casos de epidemia los índices pueden alcanzar hasta 500 casos por cada 100.000 personas al año. La mortalidad es extremadamente alta, del 10-20% en los Estados Unidos y mucho mayor en los países en vías de desarrollo. Después de la presentación de la vacuna conjugada contra *Haemophilus influenzae*, *N. meningitidis* es la causa principal de meningitis bacteriana en todas las edades en los Estados Unidos (Schuchat y col (1997) referido anteriormente).

25 Según el polisacárido capsular del organismo se han identificado 12 serogrupos de *N. meningitidis*. El grupo A es el patógeno implicado más a menudo en la enfermedad epidémica en el África Subsahariana. Los serogrupos B y C son responsables de la amplia mayoría de casos en los Estados Unidos y en la mayoría de los países en vías de desarrollo. Los serogrupos W135 e Y son responsables del resto de casos de los Estados Unidos y de los países en vías de desarrollo. La vacuna contra meningococos usada actualmente es una vacuna de polisacárido tetravalente constituida por serogrupos A, C, Y y W135. Aunque es eficaz en adolescentes y en adultos, induce una respuesta inmune pobre y una corta duración de la protección, y no puede usarse en lactantes [por ejemplo, Morbidity and Mortality weekly report, Vol. 46, N° RR-5 (1997)]. Esto es debido a que los polisacáridos son antígenos independientes de las células T que inducen una respuesta inmune débil que no puede reforzarse mediante la inmunización repetida. Después del éxito de la vacunación contra *H. influenzae*, se han desarrollado vacunas conjugadas contra serogrupos A y C y están en la etapa final del ensayo clínico (Zollinger WD "New and Improved Vaccines Against Meningococcal Disease". En: New Generation Vaccines, referido anteriormente, págs. 469-488; Lieberman y col (1996) referido anteriormente; Costantino y col (1992) Development and phase I clinical testing of a conjugate vaccine against meningococcus A and C. Vaccine 10: 691-698).

40 Sin embargo, el meningococo B (menB) sigue siendo un problema. Este serotipo es responsable actualmente de aproximadamente el 50% de todas las meningitis en los Estados Unidos, Europa, y Sudamérica. El enfoque de polisacáridos no puede usarse debido a que el polisacárido capsular de menB es un polímero de ácido N-acetil neuramínico con enlace  $\alpha(2-8)$  que también está presente en el tejido de los mamíferos. Esto produce tolerancia al antígeno; de hecho, si se provocara una respuesta inmune, sería auto-inmune, y por lo tanto no deseable. Para evitar la inducción de auto-inmunidad y para inducir una respuesta inmune protectora, se ha modificado el polisacárido capsular sustituyendo los grupos N-acetilo con grupos N-propionilo, dejando inalterada la antigenicidad específica (Romero & Outschoorn (1994) Current status of Meningococcal group B vaccine candidates: capsular or non-capsular? Clin Microbiol Rev 7(4): 559-575).

50 Los enfoques alternativos para vacunas contra menB han usado mezclas complejas de proteínas de la membrana externa (OMP), que contenían o las OMP en solitario u OMP enriquecidas con porinas o con una delección en las OMP de clase 4 que se cree induce anticuerpos que bloquean la actividad bactericida. Este enfoque produce vacunas que no están bien caracterizadas. Éstas son capaces de proteger contra la cepa homóloga, pero no son eficaces en general, ya que existen muchas variantes antigénicas de las proteínas de la membrana externa. Para superar la variabilidad antigénica, se han construido vacunas multivalentes que contienen hasta nueve porinas diferentes (por ejemplo, Poolman JT (1992) Development of a meningococcal vaccine. Infect. Agents Dis, 4: 13-28). Las proteínas adicionales a usarse en vacunas de la membrana externa han sido las proteínas opa y opc, pero ninguno de estos enfoques ha sido capaz de superar la variabilidad antigénica (por ejemplo, Ala'Aldeen & Borriello (1996) The meningococcal transferrin-binding proteins 1 and 2 are both surface exposed and generate bactericidal antibodies capable of killing homologous and heterologous strains. Vaccine 14(1): 49-53).

60 Para los genes y proteínas de los gonococos y meningococos está disponibles una cierta cantidad de datos de secuencia (por ejemplo documentos EP-A-0467714, WO 96/29412), pero no están de ninguna manera completos. Otras proteínas de men B pueden incluir aquellas enumeradas en los documentos WO 97/28273, WO

96/29412, WO 95/03413, US 5.439.808, US 5.879.686,

El suministro de secuencias adicionales podría proporcionar una oportunidad para identificar proteínas secretadas o expuestas en la superficie que sean presuntas dianas para el sistema inmune y que no sean variables antigénicamente. Por ejemplo, algunas de las proteínas identificadas podrían ser componentes de vacunas eficaces contra meningococos B y algunas podrían ser componentes de vacunas contra todos los serotipos de meningococos y otras podrían ser componentes de vacunas contra todos las especies de *Neisseria* patogénicas incluyendo *Neisseria meningitidis* o *Neisseria gonorrhoeae*. Estas secuencias específicas para *N. meningitidis* o *N. gonorrhoeae* que se conservan mejor son secuencias preferidas adicionalmente.

Por lo tanto es un objetivo de la invención proporcionar secuencias de ADN de *Neisseria* que codifiquen proteínas que sean antigénicas o inmunogénicas.

#### LA INVENCION

La invención proporciona proteínas que comprende las secuencias de aminoácidos de *N. meningitidis* y las secuencias de aminoácidos *N.gonorrhoeae* descritas en el ejemplo.

También proporciona proteínas que comprenden secuencias homólogas (es decir, aquellas que tienen identidad de secuencias) con las secuencias de aminoácidos de *N.meningitidis* descritas en el ejemplo. Dependiendo de la secuencia particular, el grado de homología (identidad de secuencia) es preferentemente mayor del 90% (por ejemplo, 90%, 95%, 99% o más). Estas proteínas incluyen mutantes y variantes alélicas de las secuencias descritas en el ejemplo. Típicamente, se considera que 50% de identidad o más entre dos proteínas es una indicación de equivalencia funcional. La identidad entre proteínas se determina preferentemente mediante el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman como está implementado en el programa MPSRCH (Oxford Molecular) usando una búsqueda de huecos afines con parámetros: penalización de hueco 12, penalización de extensión del hueco 1.

Las proteínas de la invención pueden, por supuesto, prepararse mediante 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 preparan preferentemente en forma sustancialmente pura o aislada (es decir, sustancialmente libres de otras proteínas celulares del huésped de *N. meningitidis* o *N. gonorrhoeae*).

De acuerdo con un aspecto adicional, la invención proporciona anticuerpos que se unen con estas proteínas. Éstos pueden ser policlonales o monoclonales y pueden producirse mediante cualquier medio adecuado.

De acuerdo con un aspecto adicional, la invención proporciona ácidos nucleicos que comprenden las secuencias de nucleótidos de *N. meningitidis* y las secuencias de nucleótidos *N.gonorrhoeae* descritas en el ejemplo

De acuerdo con un aspecto adicional, la invención comprende un ácido nucleico que hibrida con las secuencias proporcionadas en el presente documento. Las condiciones para hibridación se exponen en el presente documento.

De acuerdo con un aspecto adicional, la invención proporciona ácido nucleico que codifica las proteínas y los fragmentos de proteínas de la invención.

Se apreciaría también que la invención proporciona ácido nucleico que comprende secuencias complementarias a las descritas anteriormente (por ejemplo, para fines de antisentido o de sondeo).

Los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención pueden, por supuesto, prepararse de muchas maneras (por ejemplo, mediante síntesis química, en todo o en parte, a partir de bibliotecas genómicas o de ADNc, a partir del propio organismo, etc.) y pueden tomar diversas formas (por ejemplo, de cadena sencilla, de doble cadena, vectores, sondas, etc.).

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

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

De acuerdo con un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones que comprenden proteína, anticuerpo y/o ácido nucleico de acuerdo con la invención. Estas composiciones pueden ser adecuadas como vacunas, por ejemplo, o como reactivos de diagnóstico o como composiciones inmunogénicas.

La invención también proporciona ácido nucleico, proteína o anticuerpo de acuerdo con la invención para usar como medicamentos (por ejemplo, como vacunas) o como reactivos de diagnóstico. También proporciona el uso de un ácido nucleico, proteína o anticuerpo de acuerdo con la invención en la fabricación de (i) un medicamento para prevenir la infección debida a bacterias de *Neisseria* (ii) un reactivo de diagnóstico para detectar la presencia de bacterias de *Neisseria* o de anticuerpos generados contra bacterias de *Neisseria* o (iii) para generar anticuerpos.

Se proporciona un procedimiento para producir proteínas de la invención, que comprende la etapa de cultivar una célula huésped de acuerdo con la invención en condiciones que inducen la expresión de proteínas.

Habiendo descrito la invención en general, ésta se entenderá más fácilmente en referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo de ilustración, y no se desean para ser limitación de la presente invención, a menos que se especifique.

#### Metodología - Resumen de procedimientos y técnicas estándar

##### General

Esta invención proporciona secuencias de nucleótidos de menB de *Neisseria meningitidis*, secuencias de aminoácidos codificadas en su interior. Con estas secuencias descritas, pueden producirse ensayos de sondas de ácidos nucleicos y casetes y vectores de expresión. Los vectores de expresión pueden transformarse en células huésped para producir proteínas. Los polipéptidos purificados o aislados (que también pueden sintetizarse químicamente) pueden usarse para producir anticuerpos para detectar proteínas de menB. Además, las células huésped o sus extractos pueden utilizarse para ensayos biológicos para aislar agonistas o antagonistas. Además, con estas secuencias alguien puede buscar identificar marcos de lectura abiertos e identificar secuencias de aminoácidos. Las proteínas también pueden usarse en composiciones inmunogénicas, composiciones antigénicas y como componentes de vacuna.

La puesta en práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro del alcance de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, por ejemplo, Sambrook Molecular Cloning; A Laboratory Manual, segunda edición (1989); DNA Cloning, Volúmenes I y II (D.N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed, 1984); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); Transcription and Translation (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); Animal Cell Culture (R.I. Freshney ed. 1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); The Methods in Enzymology series (Academic Press, Inc), especialmente volúmenes 154 y 155; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.H. Miller y M.P. Calos eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Mayer and Walker, eds. (1987), Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London); Scopes (1987) Protein Purification: Principles and Practice, Segunda edición (Springer-Verlag, N.Y.), y Handbook of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell eds 1986).

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

##### Sistemas de Expresión

Las secuencias de nucleótidos de menB de *Neisseria* pueden expresarse en diversos sistemas de expresión diferentes; por ejemplo los utilizados con células de mamífero, células vegetales, baculovirus, bacterias y levaduras.

##### i. Sistemas de Mamíferos

En la técnica se conocen sistemas de expresión en mamíferos. Un promotor de mamífero es cualquier secuencia de ADN capaz de unir la ARN polimerasa de mamíferos e iniciar la transcripción cadena abajo (3') de una secuencia codificante (por ejemplo un gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de iniciación de la transcripción, que se sitúa normalmente en posición proximal al extremo 5' de la secuencia codificante y una caja TATA, normalmente situada 25-30 pares de bases (pb) cadena arriba del sitio de iniciación de la transcripción. Se cree que la caja TATA dirige la ARN polimerasa II para que comience la síntesis de ARN en el sitio correcto. Un promotor de mamífero también contendrá un elemento promotor cadena arriba, situado normalmente en 100 o 200 pb cadena arriba de la caja TATA. Un elemento promotor cadena arriba determina el índice con el que se inicia la transcripción y puede actuar en cualquier orientación (Sambrook y col (1989) "Expression of Clone Genes in Mammalian Cells" In Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed.).

Los genes virales de mamífero se expresan a menudo en gran cantidad y tienen un amplio intervalo de huéspedes; por lo tanto las secuencias que codifican genes virales de mamífero proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Los ejemplos incluyen el promotor temprano de SV40, el promotor LTR del virus de tumor mamario de ratón, el promotor tardío principal de adenovirus (Ad MLP), y el promotor del virus herpes

simplex. Además, las secuencias derivadas de genes no virales, tales como el gen de metalotioneína de ratón, también proporcionan secuencias promotoras útiles. La expresión puede ser constitutiva o regulada (inducible). Dependiendo del promotor seleccionado, muchos promotores pueden ser inducibles usando sustratos conocidos, tales como el uso del promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV) con el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) que se induce mediante glucocorticoides en células transformadas de respuesta a hormonas (véase por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.783.681).

La presencia de un elemento potenciador (potenciador), combinado con los elementos promotores descritos anteriormente, normalmente aumentará los niveles de expresión. Un potenciador es una secuencia de ADN reguladora que puede estimular la transcripción hasta 1.000 veces cuando se une a promotores homólogos o heterólogos, con la síntesis comenzando en el sitio de iniciación del ARN normal. Los potenciadores también son activos cuando se sitúan cadena arriba o cadena abajo del sitio de iniciación de la transcripción, en orientación bien normal o bien invertida, o a una distancia de más de 1.000 nucleótidos del promotor (Maniatis y col. (1987) *Science* 236: 1237; Alberts y col. (1989) *Molecular Biology of the Cell*, 2ª ed.). Los elementos potenciadores obtenidos a partir de virus pueden ser particularmente útiles, debido a que normalmente tienen un intervalo de huéspedes más amplio. Los ejemplos incluyen el potenciador del gen temprano de SV40 (Dijkema y col. (1985) *EMBO J.* 4: 761) y los potenciadores/promotores obtenidos de la repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma de Rous (Gorman y col. (1982b) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 6777) y del citomegalovirus humano (Boshart y col. (1985) *Cell* 41: 521). Además, algunos potenciadores son regulables y llegan a ser activos solamente en presencia de un inductor, tal como una hormona o un ión metálico (Sassone-Corsi y Borelli (1986) *Trends Genet.* 2: 215; Maniatis y col. (1987) *Science* 236: 1237).

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

Alternativamente, las proteínas extrañas también pueden secretarse a partir de la célula al medio de cultivo creando moléculas de ADN quiméricas que codifican una proteína de condensación constituida por un fragmento de secuencia líder que posibilita la secreción de la proteína extraña en células de mamífero. Preferentemente, existen sitios de procesamiento codificados entre el fragmento líder y el gen extraño que pueden escindirse *in vivo* o *in vitro*. El fragmento de secuencia líder codifica usualmente un péptido señal constituido por aminoácidos hidrófobos que dirigen la secreción de la proteína a partir de la célula. El líder tripartito de adenovirus es un ejemplo de una secuencia líder que posibilita la secreción de una proteína extraña en células de mamífero.

Usualmente, las secuencias de terminación de la transcripción y de poliadenilación reconocidas por las células de mamífero son regiones reguladoras situadas en posición 3' con respecto al codón de terminación de la traducción y por lo tanto, junto con los elementos promotores, flanquean a la secuencia codificante. El extremo 3' del ARNm maduro se forma mediante escisión y poliadenilación postranscripcionales específicas de sitio (Bimstiel y col. (1985) *Cell* 41: 349; Proudfoot y Whitelaw (1988) "Termination and 3' end processing of eukaryotic RNA. En *Transcription and splicing* (ed. B.D. Hames y D.M. Glover); Proudfoot (1989) *Trends Biochem. Sci.* 14: 105). Estas secuencias dirigen la transcripción de un ARNm que puede traducirse en el polipéptido codificado por el ADN. Los ejemplos de señales de terminador de la transcripción/poliadenilación incluyen los obtenidos de SV40 (Sambrook y col. (1989) "Expression of cloned genes in cultured mammalian cells." En *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*).

Usualmente, los componentes descritos anteriormente, que comprenden un promotor, señal de poliadenilación y secuencia de terminación de la transcripción se colocan conjuntamente en construcciones de expresión. También pueden incluirse, si se desea, en una construcción de expresión potenciadores, intrones con sitios donadores y aceptores de corte y empalme funcionales y secuencias líderes. Las construcciones de expresión se mantienen a menudo en un replicón, tal como un elemento extracromosómico (por ejemplo, plásmidos) capaz del mantenimiento estable en un huésped, tal como células de mamífero o bacterias. Los sistemas de replicación en mamíferos incluyen aquellos derivados de virus animales, que requieren factores que actúan en dirección trans para replicarse. Por ejemplo, los plásmidos que contienen el sistema de replicación de papovavirus, tales como SV40 (Gluzman (1981) *Cell* 23: 175) o poliomavirus, se replican a un número de copias extremadamente alto en presencia del antígeno T viral apropiado. Los ejemplos adicionales de replicones de mamífero incluyen los obtenidos de papilomavirus bovino y del virus Epstein-Barr. Adicionalmente, el replicón puede tener dos sistemas de replicación, lo que le permite mantenerse, por ejemplo, en células de mamífero para su expresión y en un huésped procarionta para clonación y amplificación. Los ejemplos de dichos vectores lanzadera mamífero-bacteria incluyen pMT2 (Kaufman y col. (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9: 946) y pHEBO (Shimizu y col. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6: 1074).

El procedimiento de transformación usado depende del huésped a transformarse. Los procedimientos para la introducción de los polinucleótidos heterólogos en las células de mamífero se conocen en la técnica e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación por fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, condensación de protoplastos, encapsulación del/de los polinucleótido(s) en liposomas y microinyección directa del ADN en los núcleos.

Las líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión se conocen en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles a partir de la American Type Culture Collection (ATCC, Colección Americana de Cultivos Tipo), incluyendo aunque sin limitarse 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 varias líneas celulares diferentes.

## ii. Sistemas de Expresión de Células Vegetales

Hay muchos sistemas de expresión genética de cultivo de células vegetales y de plantas completas conocidos en la técnica. Los sistemas de expresión genética en células vegetales ejemplares incluyen aquellos que se describen en patentes tales como: U.S. 5.693.506; U.S. 5.659.122; y U.S. 5.608.143. Ejemplos adicionales de expresión genética en cultivo de células vegetales se han descrito por Zenk, *Phytochemistry* 30: 3861-3863 (1991). Además pueden encontrarse descripciones de péptidos señal de proteínas vegetales además de 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); Wirsel y col., *Molecular Microbiology* 3: 3-14 (1989); Yu y col., *Gene* 122: 247-253 (1992). Una descripción de la regulación de expresión de genes vegetales mediante la fitohormona, ácido giberélico y las enzimas secretadas inducidas por el ácido giberélico puede encontrarse en los documentos de R.L. Jones y J. MacMillin, *Gibberellins*: en: *Advanced Plant Physiology*. Malcolm B. Winkins, ed., 1984 Pitman Publishing Limited, London págs. 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).

Típicamente, usando técnicas conocidas en la técnica, se inserta una secuencia de polinucleótidos deseada dentro de un casete de expresión que comprende elementos reguladores genéticos diseñados para el funcionamiento en plantas. El casete de expresión se inserta en un vector de expresión deseado con secuencias acompañantes cadena arriba y cadena debajo de la casete de expresión adecuada para la expresión en un huésped vegetal. La secuencias acompañantes serán de origen viral o plasmídico y proporcionan las características necesarias para el vector para permitirle mover el ADN de un huésped de clonación original, tal como una bacteria, al huésped vegetal deseado. La construcción vector-bacteria/planta básica proporcionará preferentemente un origen de replicación procariota de amplio intervalo de huéspedes; un marcador seleccionable procariota; y, para transformaciones de *Agrobacterium*, secuencias de ADN T para la transferencia mediada por *Agrobacterium* a cromosomas vegetales. Donde el gen heterólogo no es susceptible de detección fácilmente, la construcción tendrá preferiblemente un gen marcador seleccionable adecuado para determinar si una célula vegetal se ha transformado. Una revisión general de los marcadores adecuados, por ejemplo para los miembros de la familia de las gramíneas, se encuentra en el documento Wilmlink y Dons, 1993, *Plant Mol. Biol. Repr.* 11 (2): 165-185.

También se recomiendan las 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 recombinación homóloga así como secuencias Ti que permiten la inserción aleatoria de una casete de expresión heteróloga en un genoma vegetal. Los marcadores seleccionables procariotas adecuados incluyen de resistencia a antibióticos tales como ampicilina o tetraciclina. También pueden estar 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 incluirse en una casete de expresión para la expresión de la(s) proteína(s) de interés. Usualmente, solamente habrá un casete de expresión, aunque sean factibles dos o más. El casete de expresión recombinante contendrá, además de la secuencia que codifica la proteína heteróloga, los siguientes elementos, una región promotora, secuencias sin traducir 5' vegetales, codón de iniciación dependiendo de si el gen estructural viene o no equipado con uno, y una secuencia de terminación de la transcripción y de la traducción. Los sitios de restricción enzimática únicos en los extremos 5' y 3' de la casete permiten la fácil inserción en un vector pre-existente.

Una secuencia codificante heteróloga puede ser para cualquier proteína relacionada con la presente invención. La secuencia que codifica a la proteína de interés codificará un péptido señal que permitirá el procesamiento y la translocación de la proteína, según sea apropiado, y carecerá usualmente de cualquier secuencia que pudiera dar como resultado la unión de la proteína deseada de la invención a una membrana. Ya que, para la mayoría, la región de iniciación de la transcripción será la de un gen que se expresa y se transloca durante la germinación, empleando el péptido señal que posibilita la translocación, alguien puede proporcionarlo también para la translocación de la proteína de interés. De este modo, la(s) proteína(s) de interés se translocarán a partir de las células en las que se expresan y podrán recogerse de forma eficaz. Típicamente la secreción en las semillas es a través de la aleurona o a través de la capa de epitelio del escutelo dentro del endospermo de la semilla. Mientras que no es necesario que la proteína se secrete a partir de las células en las que la proteína se produce, esto facilita el aislamiento y la purificación de la proteína recombinante.

Dado que la expresión definitiva del producto génico deseado será en una célula eucariota es deseable determinar si cualquier porción del gen clonado contiene secuencias que se procesarán como intrones por la maquinaria de corte y empalme del huésped. Si esto fuera así, puede realizarse mutagénesis dirigida de la región "intrón" para evitar la pérdida de una porción del mensaje genético en forma de falso código intrón, Reed y Maniatis, Cell 41: 95-105, 1985.

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

El vector también puede introducirse dentro de las células vegetales mediante electroporación (Fromm y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5824, 1985). En esta técnica, los protoplastos vegetales se someten a electroporación en presencia de plásmidos que contienen la construcción génica. Los impulsos eléctricos de alto potencial iónico permeabilizan de forma reversible las membranas biológicas permitiendo la introducción de los plásmidos. Los protoplastos vegetales electroporados vuelven a formar la pared celular, se dividen y forman callos vegetales.

Todas las plantas a partir de las que pueden aislarse y cultivarse protoplastos para proporcionar plantas regeneradas completas pueden transformarse mediante la presente invención de modo que se recuperen plantas completas que contienen el gen transferido. Se sabe que prácticamente todas las plantas pueden regenerarse a partir de células o tejidos cultivados, incluyendo pero no limitadas a todas las especies importantes de caña de azúcar, remolacha de azúcar, algodón, fruta y otros árboles, legumbres y verduras. Algunas plantas adecuadas incluyen por ejemplo las especies de los géneros *Fragaria*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Vigna*, *Citrus*, *Linum*, *Geranium*, *Manihot*, *Daucus*, *Arabidopsis*, *Brassica*, *Raphanus*, *Sinapis*, *Atropa*, *Capsicum*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Lycopersion*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Petunia*, *Digitalis*, *Majorana*, *Cichorium*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Bromus*, *Asparagus*, *Antirrhinum*, *Hererocallis*, *Nemesia*, *Pelargonium*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Ranunculus*, *Senecio*, *Salpiglossis*, *Cucumis*, *Browaalia*, *Glycine*, *Lollum*, *Zea*, *Triticum*, *Sorghum*, y *Datura*.

Los medios de regeneración varían de especie a especie vegetales, pero generalmente se proporciona en primer lugar una suspensión de protoplastos transformados que contienen copias del gen heterólogo. Se forma tejido calloso y pueden inducirse brotes a partir de los callos, que posteriormente pueden sembrarse. Alternativamente, puede inducirse la formación de embriones a partir de la suspensión de protoplastos. Estos embriones germinan como los embriones naturales para formar plantas. Los medios de cultivo contendrán generalmente diversos aminoácidos y hormonas, tales como auxina y citocininas. También es ventajoso añadir ácido glutámico y prolina al medio, especialmente para especies tales como maíz y alfalfa. Los brotes y las raíces se desarrollan normalmente de forma simultánea. La regeneración eficaz dependerá del medio, del genotipo, y del historial del cultivo. Si se controlan estas tres variables, entonces la regeneración es totalmente reproducible y repetible.

En algunos sistemas de cultivo de células vegetales, la proteína deseada de la invención puede excretarse o, alternativamente, la proteína puede extraerse a partir de la planta completa. En los casos en los que la proteína de la invención se secreta al medio, ésta puede recogerse. Alternativamente, los embriones y las semillas sin embrión u otro tejido vegetal pueden romperse mecánicamente para liberar cualquier proteína secretada entre las células y los tejidos. La mezcla puede suspenderse en una solución tampón para recuperar las proteínas solubles. Después se utilizarán procedimientos convencionales de aislamiento y purificación de proteínas para purificar la proteína recombinante. Los parámetros de tiempo, temperatura, pH, oxígeno y volumen se ajustarán mediante procedimientos rutinarios para optimizar la expresión y la recuperación de la proteína heteróloga.

### iii. Sistemas de Baculovirus

El polinucleótido que codifica la proteína también puede insertarse en un vector de expresión en insectos adecuado, y se une de forma operativa a los elementos de control dentro de este vector. La construcción de vectores 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 tanto un fragmento del genoma del baculovirus como un sitio de restricción conveniente para la inserción del gen o genes heterólogos a expresarse; un baculovirus de tipo silvestre con una secuencia homóloga al fragmento específico de baculovirus en el vector de transferencia (esto permite la recombinación homóloga del gen heterólogo en el genoma del baculovirus); y células huésped de insecto y medios de cultivo apropiados.

Después de insertar la secuencia de ADN que codifica la proteína en el vector de transferencia, el vector y el genoma viral de tipo natural se transfectan dentro de una célula huésped de insecto donde se permite que el vector y el genoma viral recombinen. El virus recombinante encapsulado se expresa y se identifican y se purifican placas recombinantes. Los materiales y los procedimientos para sistemas de expresión de baculovirus/células de insecto están disponibles comercialmente en forma de kit de, entre otros, Invitrogen, San Diego CA (kit "MaxBac"). Estas técnicas se conocen en general por aquellos expertos en la técnica y se describen completamente en el documento de Summers y Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin N° 1555 (1987) (en lo sucesivo en este documento "Summers y Smith").

Antes de la inserción de la secuencia de ADN que codifica la proteína dentro del genoma del baculovirus, los componentes descritos anteriormente, que comprenden un promotor, una secuencia líder (si se desea), la secuencia codificante de interés y la secuencia de terminación de la transcripción, se ensamblan usualmente en una construcción de translocación intermedia (vector de transferencia). Esta construcción puede contener un único gen y elementos reguladores unidos de forma operativa; múltiples genes, cada uno con su propio conjunto de elementos reguladores unidos de forma operativa; o múltiples genes, regulados por el mismo conjunto de elementos reguladores. Las construcciones de translocación intermedias 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, que le permitirá mantenerse así en un huésped adecuado para la clonación y la amplificación.

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

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

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

Los genes estructurales, abundantemente transcritos en los últimos momentos en un ciclo de infección vírica, proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Los ejemplos incluyen secuencias derivadas del gen que codifica una proteína poliédrica viral, Friesen y col., (1996) "The Regulation of Baculovirus Gene Expression" en: "The Molecular Biology of Baculoviruses (ed. Walter Doerfler): Publicación EPO N°s 127 839 y 155 476; y el gen que codifica la proteína p10, Vlák y col., (1988), J. Gen. Virol. 69: 765.

El ADN que codifica secuencias señal adecuadas puede derivarse de genes para proteínas de insecto o de baculovirus secretadas, tales como el gen de la polihedrina de baculovirus (Carbonell y col. (1988) *Gene*, 73: 409). Alternativamente, dado que las señales para las modificaciones post-traduccionales de células de mamífero (tales como la escisión de péptido señal, escisión proteolítica, y fosforilación) parecen reconocerse por las células de insecto, y las señales requeridas para la secreción y la acumulación nuclear también parecen conservarse entre las células de vertebrados y las células de vertebrados, líderes de origen no insecto, tales como aquellos obtenidos de los genes que codifican interferón- $\alpha$  (alfa) humano, Maeda y col., (1986), *Nature* 315: 592; péptido de liberación de gastrina humana, Lebacqz-Verheyden y col., (1988), *Molec. Cell. Biol.* 8: 3129; IL-2 humana, Smith y col., (1985) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 82: 8404; IL-3 de ratón, (Miyajima y col., (1987) *Gene* 58: 273; y glucocerebrosidasa humana; Martin y col., (1988) *DNA*, 7: 99, se pueden usar también para permitir secreción en insectos.

Un polipéptido o poliproteína recombinante puede expresarse de forma intracelular o, si se expresa con las secuencias reguladoras apropiadas, puede secretarse. La expresión intracelular buena de proteínas extrañas sin condensar usualmente requiere genes heterólogos que idealmente tienen una secuencia líder corta que contiene señales de iniciación de la traducción adecuadas precediendo a una señal de iniciación ATG. Si se desea, la metionina en el extremo N puede escindirse de la proteína madura mediante incubación *in vitro* con bromuro de cianógeno.

Alternativamente, las poliproteínas o proteínas recombinantes que no se secretan de forma natural pueden secretarse a partir de la célula de insecto creando moléculas de ADN quiméricas que codifican una proteína de condensación constituida por un fragmento de secuencia líder que permite la secreción de las proteínas extrañas en



insectos. El fragmento de secuencia líder codifica usualmente un péptido señal constituido por aminoácidos hidrófobos que dirigen la translocación de la proteína al retículo endoplasmático.

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

15 El vector de expresión de baculovirus recién formado se empaqueta subsiguientemente en un baculovirus recombinante infeccioso. La recombinación homóloga se produce a baja frecuencia (entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 5%); por lo tanto, la mayoría del virus producido después de la co-transfección es aún virus de tipo silvestre. Por lo tanto, es necesario un procedimiento para identificar virus recombinantes. Una ventaja del sistema de expresión es una selección visual que permite distinguir virus recombinantes. La proteína polihedrina, que es producida por el virus silvestre, se produce a niveles muy altos en los núcleos de las células infectadas en las etapas tardías después de la infección vírica. La proteína polihedrina acumulada forma cuerpos de oclusión que también contienen partículas incluidas. Estos cuerpos de oclusión, de hasta 15 µm en tamaño, tienen gran capacidad de refracción, lo que les proporciona una apariencia brillante que se visualiza fácilmente en el microscopio óptico. Las células infectadas con virus recombinantes carecen de cuerpos de oclusión. Para distinguir virus recombinante de virus de tipo silvestre, se plaquea el sobrenadante de transfección en una monocapa de células de insecto mediante técnicas conocidas por aquellos expertos en la técnica. A saber, las placas se exploran en el microscopio óptico para detectar la presencia (indicativa de virus de tipo silvestre) o ausencia (indicativa de virus recombinantes) de cuerpos de oclusión. Current Protocols in Microbiology Vol. 2 (Ausubel y col., eds) a 16.8 (Supp. 10, 1990), Summers y Smith, referido anteriormente, Miller y col., (1989).

20 Se han desarrollado vectores de expresión de baculovirus recombinantes para la infección de varias células de insecto. Por ejemplo, se han desarrollado baculovirus recombinantes para entre otros *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni* (publicación PCT N° WO 89/046699; Carbonell y col., (1985) J. Virol. 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).

25 Las células y los medios de cultivo celular están disponibles comercialmente para la expresión directa como de condensación de polipéptidos heterólogos en un baculovirus/sistema de expresión de baculovirus; la tecnología del cultivo celular se conoce generalmente por los expertos en la materia. Véase por ejemplo Summers y Smith referido anteriormente.

30 Las células de insecto modificadas pueden cultivarse después en un medio nutriente adecuado, lo que permite el mantenimiento estable del/ de los plásmido(s) presente(s) en el huésped insecto modificado. Donde el gen producido por la expresión está bajo control inducible, el huésped puede cultivarse hasta alta densidad y puede inducirse la expresión. Alternativamente, cuando la expresión es constitutiva, el producto se expresará de forma continua en el medio y el medio nutriente debe circular de forma continua, mientras se retira el producto de interés y se aumentan los nutrientes agotados. El producto puede purificarse mediante técnicas tales como cromatografía, por ejemplo HPLC, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, etc., electroforesis; centrifugación por gradiente de densidad; extracción del disolvente, o similares. Según sea apropiado, el producto puede purificarse adicionalmente, según se requiera, tal como para retirar sustancialmente cualesquiera proteínas de insecto que se segreguen en el medio o resulten de la lisis de células de insectos, tal como para proporcionar un producto que esté al menos sustancialmente libre de restos del huésped, por ejemplo, proteínas, lípidos y polisacáridos.

35 Con el fin de obtener la expresión de las proteínas, se incuban las células huésped recombinantes obtenidas de los transformantes en condiciones que permiten 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 determinables por aquellos de habilidad normal en la técnica, en base a lo que se conoce en la técnica.

#### iv. Sistemas Bacterianos

40 En la técnica se conocen técnicas de expresión bacteriana. Un promotor bacteriano es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción cadena abajo (3') de una

secuencia codificante (por ejemplo gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de iniciación de la transcripción que se sitúa normalmente en posición proximal con respecto al extremo 5' de la secuencia codificante. Esta región de iniciación de la transcripción usualmente incluye un sitio de unión a la ARNm polimerasa y un sitio de iniciación de la transcripción. Un promotor bacteriano puede tener también un segundo dominio llamado un operador, que puede solaparse con un sitio de unión de ARN polimerasa adyacente en el que comienza la síntesis de ARN. El operador permite la transcripción regulada negativamente (inducible), ya que una proteína represora del gen puede unirse al operador y por lo tanto inhibir la transcripción de un gen específico. La expresión constitutiva puede producirse en la ausencia de elementos reguladores negativos, tales como el operador. Además, puede conseguirse la regulación positiva mediante una secuencia de unión a la proteína activadora del gen, que, si está presente, está normalmente en posición proximal (5') con respecto a la secuencia de unión a la ARN polimerasa. Un ejemplo de una proteína activadora del gen es la proteína activadora del catabolito (CAP), que ayuda a iniciar de la transcripción del operón *lac* en *Escherichia coli* (*E. coli*) (Raibaud y col., (1984) Annu. Rev. Genet. 18: 173). Por lo tanto la expresión regulada puede ser bien positiva o bien negativa, potenciando o reduciendo de este modo la transcripción.

Las secuencias que codifican enzimas de rutas metabólicas 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 biosintéticas tales como triptófano (*trp*) (Goeddel y col., (1980) Nuc. Acids Res 8: 4057; Yelverton y col., (1981) Nucl. Acids Res. 9: 731, Patente de Estados Unidos 4.738.921; Publicación EPO N° 036 776 y 121 775). El sistema promotor de beta-lactamasa (*bla*) (Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes". En *Interferon 3* (ed. I. Gresser)), el bacteriófago lambda PL (Shimatake y col., (1981) Nature 292: 128) y los sistemas promotores T5 (Patente de Estados Unidos 4.689.406) también proporcionan secuencias promotoras útiles.

Además, los promotores sintéticos que no se encuentran en la naturaleza también funcionan como promotores bacterianos. Por ejemplo, las secuencias de activación de la transcripción de un promotor bacteriano o promotor de bacteriófago pueden unirse con las secuencias de operón de otro promotor bacteriano o promotor de bacteriófago, creando un promotor híbrido sintético (Patente de Estados Unidos 4.551.433). Por ejemplo, el promotor *tac* es un promotor *trp-lac* híbrido constituido tanto por el promotor *trp* como por las secuencias del operón *lac* que está regulado por el represor *lac* (Amann y col., (1983) Gene 25: 167; de Boer y col., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 21). Además, un promotor bacteriano puede incluir promotores de origen natural de origen no bacteriano que tengan la capacidad de unirse a ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción. Un promotor de origen natural de origen no bacteriano puede acoplarse también con una ARN polimerasa compatible para producir altos niveles de expresión de algunos genes en procariontes. El sistema de ARN polimerasa/promotor del bacteriófago T7 es un ejemplo de un sistema promotor acoplado (Studier y col., (1986) J. Mol. Biol. 189: 113, Tabor y col., (1985) Proc Natl Acad. Sci. 82: 1074). Además, un promotor híbrido puede estar constituido también por un promotor bacteriófago y una región operadora de *E. coli* (publicación EPO N° 267 851).

Además de la secuencia promotora en funcionamiento, un sitio de unión al ribosoma eficaz también es útil para la expresión de genes extraños en procariontes. En *E. coli*, el sitio de unión al ribosoma se denomina la secuencia Shine-Dalgarno (SD) e incluye un codón de iniciación (ATG) y una secuencia de 3-9 nucleótidos de longitud situada 3-11 nucleótidos cadena arriba del codón de iniciación (Shine y col., (1975) Nature 254: 34). Se piensa que la secuencia SD promueve la unión de ARNm al ribosoma emparejando bases entre la secuencia SD y el extremo 3' del ARNr 16S de *E. coli* (Steitz y col., (1979) "Genetic signals and nucleotide sequences in Messenger RNA" En *Biological Regulation and Development: Gene Expression* (ed. R.F. Goldberger)). Para expresar genes eucariotas y genes procariontes con un sitio de unión débil al ribosoma, a menudo es necesario optimizar la distancia entre la secuencia SD y el ATG del gen eucariota (Sambrook y col., (1989) "Expression of cloned genes in *Escherichia coli*. En *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*).

Una molécula de ADN puede expresarse de forma intracelular. Una secuencia promotora puede unirse de forma directa con la molécula de ADN, caso en el que el primer aminoácido en el extremo N será siempre una metionina, que está codificada por el codón de iniciación ATG. Si se desea, la metionina en el extremo N puede escindirse de la proteína mediante incubación *in vitro* con bromuro de cianógeno o mediante incubación bien *in vivo* o bien *in vitro* con una peptidasa N terminal de metionina bacteriana (Publicación EPO N° 219 237).

Las proteínas de condensación proporcionan una alternativa a la expresión directa. Usualmente, una secuencia de ADN que codifica la porción N terminal de una proteína bacteriana endógena, u otra proteína estable, se condensa con el extremo 5' de secuencias codificantes heterólogas. Después de la expresión, esta construcción proporcionará una condensación de las dos secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, el gen de la célula del bacteriófago lambda puede unirse en el extremo 5' de un gen extraño y puede expresarse en bacterias. La proteína de condensación resultante conserva preferentemente un sitio para una enzima de procesamiento (factor Xa) para escindir la proteína del bacteriófago del gen extraño (Nagai y col. (1984) Nature 309: 810). Las proteínas de condensación también pueden prepararse con secuencias de los genes *lacZ* (Jia y col. (1987) Gene 60: 197), *trpE* (Allen y col., (1987) J. Biotechnol. 5: 93; Makoff y col., (1989) J. Gen. Microbiol. 135: 11) y *Chey* (Publicación EPO N°

324 647). La secuencia de ADN en la unión de las dos secuencias de aminoácidos pueden codificar o no un sitio escindible. Otro ejemplo es una proteína de condensación a ubiquitina. Una proteína de condensación tal se elabora con la región de ubiquitina que conserva preferiblemente un sitio para una enzima de procesamiento (por ejemplo una proteasa de procesamiento específica de ubiquitina) para escindir la ubiquitina de la proteína extraña. A través de este procedimiento, puede aislarse una proteína extraña natural (Miller y col. (1989) *BiolTechnology* 7: 698).

Alternativamente, también pueden secretarse de la célula proteínas extrañas creando moléculas de ADN quiméricas que codifican una proteína de condensación constituida por un fragmento de secuencia de péptido señal que permite la secreción de la proteína extraña en bacterias (Patente de Estados Unidos 4.336.336). El fragmento de secuencia señal usualmente codifica un péptido señal constituido por aminoácidos hidrófobos que dirigen la secreción de la proteína de la célula. La proteína se secreta en el medio de cultivo (bacterias gram positivas) o en el espacio periplasmático, situado entre la membrana interna y externa de la célula (bacterias gram negativas). Preferiblemente existen sitios de procesamiento, que puede escindirse *in vivo* o *in vitro* codificados entre el fragmento de péptido señal y el gen extraño.

El ADN que codifica secuencias de señal adecuadas puede obtenerse de genes para proteínas bacterianas secretadas, tales como el gen de la proteína de la membrana externa de *E. coli* (*ompA*) (Masui y col., (1983), en *Experimental Manipulation of Gene Expression*; Ghayeb y col. (1984) *EMBO J.* 3: 2437) y la secuencia señal de fosfatasa alcalina de *E. coli* (*phoA*) (Oka y col. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 7212). Como un ejemplo adicional, puede usarse la secuencia señal del gen de alfa-amilasa de diversas cepas de *Bacillus* para secretar proteínas heterólogas de *B. subtilis* (Palva y col. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5582; publicación EPO N° 244 042).

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

Usualmente, los componentes descritos anteriormente, que comprenden un promotor, secuencia señal (si se desea), secuencia codificante de interés, y secuencia de terminación de la transcripción, se colocan de forma conjunta 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. Este replicón tendrá un sistema de replicación, que le permite por lo tanto mantenerse en un huésped procarionta para expresión o para clonación y amplificación. Además, un replicón puede ser un plásmido bien de alto o bien de bajo número de copias. Un plásmido de alto número de copias tendrá generalmente un número de copias que varía entre aproximadamente 5 y aproximadamente 200 y normalmente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 150. Un huésped que contiene un plásmido de alto número de copias contendrá preferentemente al menos aproximadamente 10 y más preferentemente al menos aproximadamente 20 plásmidos. Puede seleccionarse un vector de alto o bajo número de copias, dependiendo del efecto del vector y de la proteína extraña sobre el huésped.

Alternativamente, las construcciones de expresión pueden integrarse en el genoma bacteriano con un vector de integración. Los vectores de integración contienen usualmente al menos una secuencia homóloga al cromosoma bacteriano que permite al vector integrarse. Las integraciones parecen ser el resultado de recombinaciones entre ADN homólogo en el vector y el cromosoma bacteriano. Por ejemplo, los vectores de integración contruidos con ADN de diversas cepas de *Bacillus* se integran en el cromosoma de *Bacillus* (publicación EPO N° 127 328). Los vectores de integración también pueden estar constituidos por secuencias de bacteriófagos o del transposón.

Usualmente, las construcciones de expresión extracromosómicas y de integración pueden contener marcadores seleccionables para permitir la selección de cepas bacterianas que se hayan transformado. Los marcadores seleccionables pueden expresarse en el huésped bacteriano y pueden incluir genes que hacen a las bacterias resistentes a fármacos tales como ampicilina, cloramfenicol, eritromicina, kanamicina (neomicina) y tetraciclina (Davies y col. (1978) *Annu. Rev. Microbiol.* 32: 469). Los marcadores seleccionables también pueden incluir genes biosintéticos, tales como aquellos de las rutas de histidina, triptófano y leucina.

Alternativamente, algunos de los componentes descritos anteriormente pueden colocarse conjuntamente en vectores de transformación. Los vectores de transformación están constituidos usualmente por un marcador seleccionable que bien se mantiene en un replicón o bien se desarrolla en un vector de integración, como se ha descrito anteriormente.

Los vectores de expresión y transformación, bien replicones extracromosómicos o bien vectores de

integración, se han desarrollado para la transformación en muchas bacterias. Por ejemplo, se han desarrollado vectores de expresión para entre otras, las siguientes bacterias: *Bacillus subtilis* (Palva y col. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 5582; publicación EPO N<sup>o</sup> 036 259 y 063 953; Publicación PCT N<sup>o</sup> WO 84/04541), *Escherichia coli* (Shimatake y col., (1981) Nature 292: 128; Amman y col., (1985) Gene 40: 183; Studier y col. (1986) J. Mol. Biol. 189: 113; Publicación EPO N<sup>o</sup> 036 776, 135 829 y 136 907), *Streptococcus cremoris* (Powell y col. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54: 655); *Streptococcus lividans* (Powell y col., (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54: 655), *Streptomyces lividans* (Patente de Estados Unidos N<sup>o</sup> 4.745.056).

Los procedimientos para introducir ADN exógeno en huéspedes bacterianos se conocen bien en la técnica, e incluyen usualmente bien la transformación de una bacteria tratada con CaCl<sub>2</sub> o bien otros agentes, tales como cationes divalentes y DMSO. También puede introducirse ADN en células bacterianas mediante electroporación. Los procedimientos de transformación varían usualmente con las especies bacterianas a transformarse. (Véase por ejemplo, uso de *Bacillus*: Masson y col. (1989) FEMS Microbiol. Lett. 60: 273, Palva y col., (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 5582; Publicación EPO N<sup>o</sup> 036 259 y 063 953; Publicación PCT N<sup>o</sup> WO 84/04541; uso de *Campylobacter*, Miller y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 856, y Wang y col. (1990) J. Bacteriol. 172: 949; uso de *Escherichia coli*: Cohen y col. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. 69: 2110; Dower y col. (1988) Nucleic Acids Res. 16: 6127; Kushner (1978) "An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids. 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, uso de *Lactobacillus*: Chassy y col. (1987) FEMS Microbiol. Lett. 44: 173, uso de *Pseudomonas*: Fiedler y col., (1988) Anal. Biochem 170: 38, uso de *Staphylococcus*: Augustin y col. (1990) FEMS Microbiol. Lett. 66: 203; uso de *Streptococcus*: Barany y col. (1980) J. Bacteriol, 144: 698; Harlander (1987) "Transformation of *Streptococcus lactis* by electroporation, en Streptococcal Genetics (ed. J. Ferretti y R. Curtiss III); Perry y col., (1981) Infect. Immun. 32: 1295; Powell y col., (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54: 655; Somkuti y col., (1987) Proc. 4th Evr. Cong. Biotechnology 1: 412.

#### v. Expresión en levaduras

Los sistemas de expresión en levaduras también se conocen por los expertos en la materia. Un promotor de levadura es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa de levadura e iniciar la transcripción cadena abajo (3') de una secuencia codificante (por ejemplo, gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de iniciación de la transcripción que se sitúa usualmente en posición proximal con respecto al extremo 5' de la secuencia codificante. Esta región de iniciación de la transcripción usualmente incluye un sitio de unión a la ARNm polimerasa (la "caja TATA") y un sitio de iniciación de transcripción. Un promotor de levadura también puede tener un segundo dominio denominado una secuencia activadora cadena arriba (UAS), que, si está presente, está normalmente en posición distal con respecto al gen estructural. La UAS permite la expresión regulada (inducible). La expresión constitutiva se produce en ausencia de una UAS. La expresión regulada puede ser positiva o negativa, potenciando o reduciendo de este modo la transcripción.

La levadura es un organismo fermentador con una ruta metabólica activa, por lo tanto las secuencias que codifican enzimas en la ruta metabólica proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Los ejemplos incluyen alcohol deshidrogenasa (ADH) (Publicación EPO N<sup>o</sup> 284 044), enolasa, glucoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, glicer aldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, (GAP o GAPDH), hexoquinasa, fosfofructoquinasa, 3-fosfoglicerato mutasa y piruvato quinasa (PyK) (Publicación EPO N<sup>o</sup> 329 203). El gen *PHO5* de levadura, que codifica fosfatasa ácida, también proporciona secuencias promotoras útiles (Myanohara y col. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1).

Además, los promotores sintéticos que no se producen en la naturaleza también funcionan como promotores de levaduras. Por ejemplo, las secuencias UAS de un promotor de levadura pueden unirse con la región de activación de la transcripción de otro promotor de levadura, creando un promotor híbrido sintético. Los ejemplos de dichos promotores híbridos incluyen la secuencia reguladora ADH unida a la región de activación de la transcripción GAP (Patentes de Estados Unidos N<sup>o</sup> 4.876.197 y 4.880.734). Otros ejemplos de promotores híbridos incluyen promotores que están constituidos por las secuencias reguladoras de los genes *ADH2*, *GAL4*, *GAL10*, o *PHO5*, combinadas con la región de activación transcripcional de un gen de la enzima glicolítica tal como GAP o PyK (Publicación EPO N<sup>o</sup> 164 556). Además, un promotor de levadura puede incluir promotores que se dan en la naturaleza de origen no de levadura que tengan 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 *Saccharomyces 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).

Una molécula de ADN puede expresarse de forma intracelular en levadura. Una secuencia promotora puede unirse de forma directa con la molécula de ADN, en cuyo caso, el primer aminoácido en el extremo N de la proteína recombinante será siempre una metionina, que está codificada por el codón de iniciación ATG. Si se desea,

la metionina en el extremo N puede escindirse de la proteína mediante incubación *in vitro* con bromuro de cianógeno.

5 Las proteínas de condensación proporcionan una alternativa para los sistemas de expresión en levadura, así como en sistemas de expresión en mamíferos, vegetales, en baculovirus y bacterianos. Usualmente, una secuencia de ADN que codifica la porción N terminal de una proteína de levadura endógena, u otra proteína estable, se condensa con el extremo 5' de las secuencias codificantes heterólogas. Después de la expresión, esta construcción proporcionará una condensación de las dos secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, el gen de la superóxido dismutasa (SOD) de levadura o de ser humano, puede unirse en el extremo 5' de un gen extraño y expresarse en levadura. La secuencia de ADN en la unión de las dos secuencias de aminoácidos puede codificar o puede no codificar un sitio escindible. Véase por ejemplo, Publicación EPO N° 196056. Otro ejemplo es una proteína de condensación a ubiquitina. Dicha proteína de condensación se elabora con la región de ubiquitina que preferentemente conserva un sitio para una enzima de procesamiento (por ejemplo, proteasa de procesamiento específica de ubiquitina) para escindir la ubiquitina de la proteína extraña. A través de este procedimiento, por lo tanto, puede aislarse una proteína extraña nativa (por ejemplo, documento WO 88/024066).

20 Alternativamente, también pueden secretarse proteínas extrañas desde la célula en los medios de cultivo creando moléculas de ADN quiméricas que codifiquen una proteína de condensación constituida por un fragmento de secuencia líder que permite la secreción en levaduras de la proteína extraña. Preferiblemente, hay sitios de procesamiento codificados entre el fragmento líder y el gen extraño que pueden escindirse *in vivo* o *in vitro*. El fragmento de secuencia líder normalmente codifica un péptido señal constituido por aminoácidos hidrófobos que dirigen la secreción de la proteína a partir de la célula.

25 El ADN que codifica secuencias señal adecuadas puede derivarse de genes para proteínas de levaduras secretadas, tales como el gen de la invertasa de levadura (Publicación EPO N° 012 873; Publicación JPO N° 62: 096.086) y el gen del factor A (Patente de Estados Unidos N° 4.588.684). Alternativamente, existen líderes de origen no de levadura, tal como un líder de interferón, que también permiten la secreción en levaduras (Publicación EPO N° 060 057).

30 Una clase preferida de líderes de secreción son aquellos que emplean un fragmento del gen del factor alfa de levadura, que contiene una secuencia señal "pre" y una región "pro". Los tipos de fragmentos de factor alfa que pueden emplearse incluyen el líder de factor alfa pre-pro de longitud completa (de aproximadamente 83 restos de aminoácidos) así como los líderes de factor alfa truncados (usualmente aproximadamente 25 a aproximadamente 50 restos de aminoácidos) (Patentes de Estados Unidos N°s 4.546.083 y 4.870.008; Publicación EPO N° 324 274). Los líderes adicionales que emplean un fragmento líder de factor alfa que permite la secreción incluyen líderes de factor alfa híbridos elaborados con una presecuencia de una primera levadura, pero una región pro de un factor alfa de una segunda levadura. (Véase por ejemplo Publicación PCT N° WO 89/02463).

40 Usualmente, las secuencias de terminación de la transcripción reconocidas por levadura son secuencias reguladoras situadas en posición 3' con respecto al codón de terminación de la traducción, y por lo tanto junto con el promotor flanquean la secuencia codificante. Estas secuencias dirigen la transcripción de un ARNm que puede traducirse al polipéptido codificado por el ADN. Los ejemplos de secuencia de terminación de la transcripción y otras secuencias de terminación reconocidas por la levadura, tales como aquellas que codifican enzimas glicolíticas.

45 Usualmente, los componentes descritos anteriormente, que comprenden un promotor, líder (si se desea), secuencia codificante de interés, y secuencia de terminación de la transcripción, se colocan conjuntamente 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 una levadura o una bacteria. El replicón puede tener dos sistemas de replicación, que le permiten por lo tanto mantenerse, por ejemplo, en levadura para expresión y en un huésped procarionota para clonación y amplificación. Los ejemplos de dichos vectores lanzadera de levadura-bacteria 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). Además, una replicón puede ser bien un plásmido de alto número de copias o bien un plásmido de bajo número de copias. Un plásmido de alto número de copias tendrá generalmente un número de copias que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 200, y usualmente aproximadamente 10 a aproximadamente 150. Un huésped que contiene un plásmido de alto número de copias preferiblemente tendrá al menos aproximadamente 10, y más preferentemente al menos aproximadamente 20. Se puede seleccionar la introducción de un vector de alto o de bajo número de copias, dependiendo del efecto del vector y la proteína extraña sobre el huésped. Véase por ejemplo, Brake y col., referido anteriormente.

60 Alternativamente, las construcciones de expresión pueden integrarse en el genoma de la levadura con un vector de integración. Los vectores de integración usualmente contienen al menos una secuencia homóloga a un cromosoma de levadura que permite que el vector se integre, y preferentemente contienen dos secuencias homólogas que flanquean a la construcción de expresión. Las integraciones parecen ser el resultado de recombinaciones entre ADN homólogo en el vector y el cromosoma de levadura (Orr-Weaver y col. (1983) Methods

65

in Enzymol. 101: 228-245). Un vector de integración puede dirigirse a un locus específico en la levadura seleccionando la secuencia homóloga apropiada para la inclusión en el vector. Véase Orr-Weaver y col., referido anteriormente. Pueden integrarse Una o más construcciones de expresión, afectando posiblemente a 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 aparecer bien como un único segmento en el vector, que da como resultado la integración del vector completo, o bien como dos segmentos homólogos a segmentos adyacentes en el cromosoma y que flanquean la construcción de expresión en el vector, lo que puede dar como resultado la integración estable de solamente la construcción de expresión.

Usualmente, las construcciones de expresión extracromosómicas y de integración pueden contener marcadores seleccionables para permitir la selección de cepas de levaduras que se hayan transformado. Los marcadores seleccionables pueden incluir genes biosintéticos que pueden expresarse en el huésped de levadura, tales como *ADE2*, *HIS4*, *LEU2*, *TRP1* y *ALG7* y el gen de resistencia a G418, que confiere resistencia en células de levaduras a tunicamicina y G418, respectivamente. Además, un marcador seleccionable adecuado puede proporcionar también a la levadura la capacidad de crecer en presencia de compuestos tóxicos, tales como metal. Por ejemplo, la presencia de *CUP1* permite a la levadura crecer en presencia de iones de cobre (Butt y col. (1987) Microbiol. Rev. 51: 351).

Alternativamente, algunos de los componentes descritos anteriormente pueden colocarse conjuntamente en vectores de transformación. Los vectores de transformación usualmente están constituidos por un marcador seleccionable que bien se mantiene en un replicón o bien se desarrolla dentro de un vector de integración, como se ha descrito anteriormente.

Los vectores de expresión y transformación, bien replicones extracromosómicos o bien vectores de integración, se han desarrollado para la transformación en muchas levaduras. Por ejemplo, se han desarrollado vectores de expresión y procedimientos para introducir ADN exógeno dentro de huéspedes de levadura para, entre otras, las siguientes levaduras; *Candida albicans* (Kurtz, y col. (1986); Mol. Cell. Biol. 6: 142), *Candida maltosa* (Kunze y col. (1985) J. Basic Microbiol. 25: 141); *Hansenula polymorpha* (Gleeson, y col., (1986), J. Gen. Microbiol. 132: 3459; Roggenkamp y col., (1986) Mol. Gen. Genet. 202: 302), *Kluyveromyces fragilis* (Das, y col. (1984) J. Bacteriol. 158: 1165); *Kluyveromyces lactis* (De Louvencourt y col. (1983), J. Bacteriol. 154: 737; Van den Berg y col. (1990), Bio/Technology 8: 135); *Pichia guilliermondii* (Kunze y col., (1985) J. Basic Microbiol. 25: 141); *Pichia pastoris* (Cregg, y col (1985), Mol. Cell. Biol. 5: 3376; Patentes de Estados Unidos N<sup>os</sup> 4.837.148 y 4.929.555); *Saccharomyces cerevisiae* (Hinnen y col. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929; Ito y col., (1983) J. Bacteriol. 153: 163); *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse (1981) Nature 300: 706); y *Yarrowia lipolytica* (Davidow, y col., (1985) Curr. Genet. 10: 380471 Gaillardin, y col. (1985) Curr. Genet. 10: 49).

Los procedimientos para introducir ADN exógeno en los huéspedes de levadura se conocen bien en la técnica, y usualmente incluyen bien la transformación de esferoplastos o bien la transformación de células de levadura intactas tratadas con cationes alcalinos. Los procedimientos de transformación varían usualmente con las especies de levadura a transformar. Véase por ejemplo, [Kurtz y col. (1986) Mol. Cell. Biol. 6: 142; Kunze y col. (1985) J. Basic Microbiol. 25: 141 *Candida*]; [Gleeson, y col., (1986), J. Gen. Microbiol. 132: 3459; Roggenkamp y col., (1986) Mol. Gen. Genet. 202: 302; *Hansenula*]; [Das, y col. (1984) J. Bacteriol. 158: 1165; De Louvencourt y col. (1983), J. Bacteriol. 154: 1165; Van den Berg y col. (1990), Bio/Technology 8: 135; *Kluyveromyces*]; [Cregg, y col (1985), Mol. Cell. Biol. 5: 3376; Kunze y col. (1985); J. Basic Microbiol. 25: 141; Patentes de Estados Unidos N<sup>os</sup> 4.837.148 y 4.929.555; *Pichia*]; [Hinnen y col. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929; Ito y col. (1983) J. Bacteriol. 153: 163 *Saccharomyces*]; [Beach y Nurse (1981) Nature 300: 706; *Schizosaccharomyces*]; [Davidow, y col., (1985) Curr. Genet. 10: 39; Gaillardin, y col. (1985) Curr. Genet. 10: 49; *Yarrowia*].

#### Definiciones

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

Un fragmento de aminoácido o proteína de *Neisseria* "conservado" es uno que está presente en una proteína de *Neisseria* particular en al menos x% de *Neisseria*. El valor de x puede ser 50% o más, por ejemplo, 66%, 75%, 80%, 90%, 95% o incluso 100% (es decir, el aminoácido se encuentra en la proteína en cuestión en todas las *Neisseria*). Para determinar si un aminoácido está "conservado" en una proteína de *Neisseria* particular, es necesario comparar este resto de aminoácido en las secuencias de la proteína en cuestión de una pluralidad de *Neisseria* diferentes (una población de referencia). La población de referencia puede incluir un número de especies de *Neisseria* diferentes o puede incluir una única especie. La población de referencia puede incluir un número de serogrupos diferentes de una especie en particular o un único serogrupo. Una población de referencia preferida consiste en las 5 cepas de *Neisseria* más comunes.

El término "heterólogos" se refiere a dos componentes biológicos que no se encuentran juntos en la

naturaleza. Los componentes pueden ser células huésped, genes o regiones reguladoras, tales como promotores. Aunque los componentes heterólogos no se encuentran juntos en la naturaleza, pueden funcionar de forma conjunta, como cuando un promotor heterólogo a un gen se une de forma operativa al gen. Otro ejemplo es cuando una secuencia de *Neisseria* es heteróloga para una célula huésped de ratón.

5

“Epítipo” significa determinante antigénico, y puede obtener una respuesta celular o humoral.

Las condiciones para la “gran exactitud” son 65 C° en 0,1 xSSC 0,5 solución SDS.

10

Un “origen de replicación” es una secuencia de polinucleótidos que inicia y regula la replicación de polinucleótidos, tal como un vector de expresión. El origen de replicación se comporta como una unidad autónoma de replicación polinucleotídica en una célula, capaz de replicación bajo su propio control. Puede ser necesario un origen de replicación para que un vector se replique en una célula huésped particular. Con ciertos orígenes de replicación, un vector de expresión puede reproducirse a un elevado número de copias en presencia de las proteínas apropiadas dentro de la célula. Los ejemplos de orígenes son secuencias que se replican autónomamente, que son eficaces en levadura; y el antígeno T viral, eficaz en células COS-7.

15

20

Una secuencia “mutante” se define como un ADN, ARN o secuencia de aminoácidos que es diferente de pero que tiene una homología con la secuencia nativa o la secuencia descrita. Dependiendo de la secuencia particular, el grado de homología (identidad de secuencia) entre la secuencia nativa o la secuencia descrita y la secuencia mutante es preferentemente mayor del 50% (por ejemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más) lo que se calcula como se describe anteriormente. Como se usa en el presente documento, una “variante alélica” de una molécula de ácido nucleico, o región de ácido nucleico, para la que se proporciona secuencia de ácido nucleico en el presente documento es una molécula de ácido nucleico, o región de ácido nucleico, que aparece en esencialmente el mismo locus en el genoma de otro aislado o de un segundo aislado, y que, debido a la variación natural causada mediante, por ejemplo, mutación o recombinación, tiene una secuencia de ácido nucleico similar pero no idéntica. Una variante alélica de región codificante codifica típicamente una proteína que tiene actividad similar a aquella de la proteína codificada por el gen al que se está comparando. Una variante alélica también puede comprender una alteración en las regiones 5' o 3' no traducidas del gen, tal como en regiones de control reguladoras (véase por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.753.235).

25

30

#### Anticuerpos

35

Como se usa en este documento, el término “anticuerpo” se refiere a un polipéptido o a un grupo de polipéptidos compuesto por al menos un sitio de combinación de anticuerpos. Un “sitio de combinación de anticuerpos” es el espacio de unión tridimensional con una forma de superficie interna y una distribución de cargas complementarias a las características de un epítipo o 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 de dominio único.

40

45

Los anticuerpos contra las proteínas de la invención son útiles para cromatografía de afinidad, inmunoensayos y distinción/identificación de proteínas de menB de *Neisseria*. Los anticuerpos obtenidos contra las proteínas de la presente invención se unen a polipéptidos o a proteínas o a fragmentos de proteínas antigénicos que están presentes y se asocian específicamente con cepas de menB de *Neisseria meningitidis*. En algunos casos, estos antígenos pueden asociarse con cepas específicas, tales como aquellos antígenos específicos para las cepas de menB. Los anticuerpos de la invención pueden inmovilizarse con una matriz y utilizarse en un inmunoensayo o en una columna de cromatografía de afinidad, para permitir la detección y/o separación de polipéptidos, proteínas o fragmentos de proteínas o células que comprenden dichos polipéptidos, proteínas o fragmentos de proteínas. Alternativamente, dichos polipéptidos, proteínas o fragmentos de proteínas pueden inmovilizarse para detectar anticuerpos inibibles específicamente a ellos.

50

55

Los anticuerpos para las proteínas de la invención, tanto policlonales como monoclonales, pueden prepararse mediante procedimientos convencionales. En general, la proteína se usa primero 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 anticonejo y anticabra marcados. La inmunización se realiza generalmente mezclando o emulsionando la proteína en solución salina, preferiblemente en un coadyuvante tal como el coadyuvante completo de Freund, e inyectando la mezcla o emulsión por vía parenteral (generalmente subcutáneamente o intramuscularmente). Típicamente es suficiente una dosis de 50-200 µg/inyección. La inmunización se refuerza generalmente 2-6 semanas después con una o más inyecciones de la proteína en solución salina, preferiblemente usando coadyuvante incompleto de Freund. Alguien puede generar alternativamente anticuerpos mediante inmunización *in vitro* usando procedimientos conocidos en la técnica, que para los fines de esta invención se considera equivalente a la inmunización *in vivo*. Los antisueros policlonales se obtienen extrayendo sangre de animales inmunizados en un recipiente de vidrio o de plástico, incubando la sangre a 25°C durante 1 hora, seguido de incubación a 4°C durante 2-18 horas. El suero se recupera

60

65

mediante centrifugado (por ejemplo, a 1000 g durante 10 minutos). Pueden obtenerse de aproximadamente 20-50 ml por extracción de sangre a partir de conejos.

5 Los anticuerpos monoclonales se preparan usando el procedimiento estándar de Kohler y Milstein (Nature (1975) 256: 495-96), o una modificación del mismo. Típicamente, se inmuniza un ratón o una rata como se describe anteriormente. Sin embargo, en lugar de extraer sangre del animal para extraer el suero, el bazo (y opcionalmente varios nódulos linfáticos grandes) se extirpa y se disocia en células únicas. Si se desea, las células del bazo pueden seleccionarse (después de la retirada de células adherentes no específicas) aplicando una suspensión celular a una placa o a un pocillo recubierto con el antígeno de la proteína. Las células B que expresan inmunoglobulina unida a  
10 membrana específica para el antígeno se unen a la placa y no se eliminan mediante el aclarado con el resto de la suspensión. Las células B resultantes, o todas las células del bazo disociadas, se inducen después para que se condensen con células de mieloma para formar hibridomas, y se cultivan en un medio selectivo (por ejemplo, medio de hipoxantina, de aminopterina, de timidina, "HAT"). Los hibridomas resultantes se plaquean mediante dilución limitante, y se ensayan para la producción de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno inmunizante (y que no se unen a antígenos no relacionados). Los hibridomas que secretan MAB seleccionados se cultivan después *in vitro* (por ejemplo, en frascos de cultivo tisular o en reactores de fibra hueca) o *in vivo* (como ascitis en ratones).

Si se desea, los anticuerpos (policlonales o monoclonales) pueden marcarse usando técnicas convencionales. Las marcas adecuadas incluyen fluoróforos, cromóforos, átomos radioactivos (particularmente <sup>32</sup>P y <sup>125</sup>I), reactivos densos a electrones, enzimas y ligandos que tienen compañeros de unión específicos. Las enzimas se detectan normalmente mediante su actividad. Por ejemplo, la peroxidasa de rábano rusticano se detecta usualmente mediante su capacidad para convertir 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) a un pigmento azul, cuantificable con un espectrofotómetro. "Compañero de unión de específica" se refiere a una proteína capaz de unirse a una molécula de ligando con alta especificidad, como por ejemplo en el caso de un antígeno y un anticuerpo monoclonal específico para éste. Otros compañeros de unión específica incluyen biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A, y las numerosas parejas de receptor-ligando conocidas en la técnica. Debería entenderse que la descripción anterior no pretende categorizar las diversas marcas en diferentes clases, ya que la misma marca puede servir en varios modos diferentes. Por ejemplo, <sup>125</sup>I puede servir como una marca radioactiva o como un reactivo denso en electrones. HRP puede servir como enzima o como antígeno para un MAB. Adicionalmente, alguien puede combinar diversas marcas para el efecto deseado. Por ejemplo, los MAB y la avidina también requieren marcas en la práctica de esta invención: por lo tanto, puede marcarse un MAB con biotina, y detectarse su presencia con avidina marcada con <sup>125</sup>I, o con un MAB anti-biotina marcado con HRP. Otras permutaciones y posibilidades serán fácilmente evidentes para aquellos de habilidad normal en la técnica, y se consideran como equivalentes dentro del alcance de la presente invención.

Los antígenos, inmunógenos, polipéptidos, proteínas o fragmentos de proteína de la presente invención obtienen formación de anticuerpos compañeros de unión específica. Estos antígenos, inmunógenos, polipéptidos, proteínas o fragmentos de proteínas de la presente invención comprenden composiciones inmunogénicas de la presente invención. Dichas composiciones inmunogénicas pueden comprender o incluir adicionalmente  
40 coadyuvantes, vehículos u otras composiciones que promueven o potencian o estabilizan los antígenos, polipéptidos, proteínas o fragmentos de proteínas de la presente invención. Dichos coadyuvantes y vehículos serán fácilmente evidentes para aquellos de habilidad normal en la técnica.

#### 45 Composiciones Farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender (incluir) bien polipéptidos, anticuerpos o bien ácidos nucleicos de la invención. Las composiciones farmacéuticas comprenderán una cantidad terapéuticamente eficaz bien de polipéptidos, anticuerpos, o bien polinucleótidos de la invención reivindicada.

50 El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento se refiere a una cantidad de un agente terapéutico para tratar, mejorar o evitar una enfermedad o afección deseada, o para mostrar un efecto terapéutico o preventivo detectable. El efecto puede detectarse mediante, por ejemplo, niveles de marcadores químicos o de antígenos. Los efectos terapéuticos también incluyen reducción en los síntomas físicos, tales como temperatura corporal disminuida, cuando se administran a un paciente que está febril. La cantidad eficaz exacta para un sujeto dependerá del tamaño y la salud del sujeto, de la naturaleza y el alcance de la afección, y de los agentes terapéuticos o combinación de agentes terapéuticos seleccionados para administración. Por lo tanto, no es útil especificar una cantidad eficaz exacta por adelantado. Sin embargo, la cantidad eficaz para una situación dada puede determinarse mediante experimentación rutinaria y está dentro del juicio del médico.

60 Para los fines de la presente invención, una dosis eficaz será de 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 que se administran.

Una composición farmacéutica también puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "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  
65



cualquier vehículo farmacéutico que no induce por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición, y que puede administrarse sin toxicidad indebida. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivos. Tales vehículos se conocen bien por aquellos de habilidad normal en la técnica.

Pueden usarse en éstos 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. Una discusión exhaustiva de los excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en el documento Remington Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co. N.J. 1991).

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

## Procedimientos de Suministro

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

La administración directa de las composiciones se realizará generalmente mediante inyección, bien por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa o bien por vía intramuscular o se administrarán en el espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también pueden administrarse en una lesión. Otros modos de administración incluyen administración oral y pulmonar, supositorios y aplicaciones transdérmicas y transcutáneas, agujas, y pistolas génicas o inyectores tipo hypospray. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiples.

## Vacunas

Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser bien profilácticas (es decir, para evitar la infección) o bien terapéuticas (es decir, para tratar la enfermedad después de la infección).

Dichas vacunas comprenden antígeno(s) o inmunógeno(s) inmunizadores, polipéptido, proteína(s) o fragmentos de proteínas, o ácidos nucleicos (por ejemplo, ácido ribonucleico o ácido desoxirribonucleico) inmunogénicos, usualmente en combinación con "vehículos farmacéuticamente aceptables" que incluyen cualquier vehículo que no induce por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados son normalmente macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados lipídicos (tales como gotas de aceite o liposomas) y partículas de virus inactivados. Tales vehículos se conocen bien por aquellos de habilidad normal en la materia. Adicionalmente, estos vehículos pueden funcionar como agentes inmunoestimuladores ("coadyuvantes"). Además, el inmunógeno o antígeno puede conjugarse con un toxoide bacteriano, tal como un toxoide de difteria, tétanos, cólera, *H. pylori*, etc. patógenos.

Los coadyuvantes preferidos para potenciar la eficacia de la composición incluyen, pero no se limitan a: (1) sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.; (2) formulaciones de emulsiones de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimuladores específicos tales como péptidos de muramilo (véase a continuación) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como por ejemplo (a) MF59 (publicación PCT N° WO 90/14837), que contienen escualeno al 5%, Tween 80 al 0,5% y Span 85 al 0,5% (que contienen opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE (véase a continuación), aunque no se requieren) formuladas en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, que contiene escualano al 10%, Tween 80 al 0,4%; polímero L121 bloqueado con plurónico al 5%, y thr-MDP (véase a continuación) bien microfluidizado en una emulsión submicrométrica o bien agitado en vórtice para generar una emulsión de tamaño de partícula mayor y (c) el sistema coadyuvante Ribit<sup>TM</sup> (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene escualeno al 2%, Tween 80 a 0,2%, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo constituido por monofosforilípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (Detox<sup>TM</sup>); (3) pueden usarse coadyuvantes de saponina, tales como Stimulon<sup>TM</sup> (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) o partículas generadas a partir de los mismos tales como ISCOM (complejos inmunoestimuladores); (4) Coadyuvante Completo de Freund (CFA) y Coadyuvante 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 estimulador de las colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; (6) mutantes detoxificados de una

toxina ADP-ribosilante bacteriana tal como una toxina de cólera (CT), una toxina de pertussis (PT), o una toxina lábil al calor de *E. coli* (LT), particularmente LT-K63, LT-R73, CT-S019, PT-K9/G129; véanse, por ejemplo, documentos WO 93/13302 y WO 92/19265; y (7) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimuladores para potenciar la efectividad de la composición. Se prefieren alumbre y MF59.

5 Como se menciona anteriormente, los péptidos de muramilo incluyen, pero no se limitan a, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.

10 Las composiciones de vacuna que comprenden composiciones inmunogénicas (por ejemplo, que pueden incluir el antígeno, vehículo farmacéuticamente aceptable, y coadyuvante) contendrán normalmente diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etanol, etc. Adicionalmente, pueden estar presentes en tales vehículos, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras del pH, y similares. Alternativamente, las composiciones de vacuna que comprenden composiciones inmunogénicas pueden comprender un antígeno, polipéptido, proteína, fragmento de proteína o ácido nucleico en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 Más específicamente, las vacunas que comprenden composiciones inmunogénicas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de los polipéptidos inmunogénicos, así como cualquier otro de los componentes mencionados anteriormente, según sea necesario. Por "cantidad inmunológicamente efectiva", se quiere decir que la administración de esta cantidad a un individuo, bien en una dosis única o bien como parte de una serie, es efectiva para el tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y de la condición física del individuo a tratarse, del grupo taxonómico del individuo a tratarse (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), de la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, del grado de protección deseado, de la formulación de la vacuna, de la evaluación del médico que trata al paciente de la situación médica, y de otros factores pertinentes. Se espera que la cantidad esté dentro de un intervalo relativamente amplio que pueda determinarse a través de ensayos rutinarios.

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

25 Las composiciones inmunogénicas se administran convencionalmente parenteralmente, por ejemplo, mediante inyección, bien subcutáneamente o bien intramuscularmente. Las formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones orales y pulmonares, supositorios y aplicaciones transdérmicas y transcutáneas. El tratamiento de la dosificación puede ser un programa de dosis única y un programa de dosis múltiples. La vacuna puede administrarse junto con otros agentes inmunorreguladores.

30 Alternativamente a las vacunas basadas en proteínas, puede emplearse la vacunación con ADN (por ejemplo, Robinson & Torres (1997) *Seminars in Immunology* 9: 271-283; Donnelly y col. (1997) *Annu Rev Immunol* 15: 617-648).

#### 35 Vehículos para la Administración de Genes

Los vehículos de terapia génica para la administración de construcciones, incluyendo una secuencia codificante de un compuesto terapéutico de la invención, a administrarse al mamífero para expresión en el mamífero, pueden administrarse bien localmente o bien sistémicamente. Estas construcciones pueden utilizar enfoques de vector viral o no viral en modalidad *in vivo* o *ex vivo*. La expresión de tal secuencia codificante puede inducirse usando promotores de mamífero endógenos o promotores heterólogos. La expresión de la secuencia codificante *in vivo* puede ser constitutiva o regulada.

40 La invención incluye vehículos de administración de genes capaces de expresar las secuencias de ácido nucleico contempladas. El vehículo de administración de genes es preferentemente un vector viral y, más preferiblemente, un vector retroviral, adenoviral, viral adenoasociado (AAV), herpes viral o de alfavirus. El vector viral también puede ser un vector viral de astrovirus, coronavirus, ortomixovirus, papovavirus, paramixovirus, parvovirus, picornavirus, poxvirus o togavirus. Véase en general, Jolly (1994) *Cancer Gene Therapy* 1: 51-64; Kimura (1994) *Human Gene Therapy* 5: 845-852; Connelly (1995) *Human Gene Therapy* 6: 185-193; y Kaplitt (1994) *Nature Genetics* 6: 148-153.

45 Los vectores retrovirales se conocen bien en la técnica, incluyendo 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 el documento RNA Tumor Viruses, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985.

Las porciones del vector de terapia génica retroviral pueden derivarse de diferentes retrovirus. Por ejemplo, pueden derivarse LTR de retrovectores de un Virus de Sarcoma Murino, un sitio de unión a ARNt de un Virus de Sarcoma de Rous, una señal de empaquetado de un Virus de Leucemia Murina, y un origen de la síntesis de segunda hebra de un Virus de Leucosis Aviar.

Estos vectores retrovirales recombinantes pueden usarse para generar partículas de vector retroviral competentes para la transducción introduciéndolos en líneas celulares de empaquetado apropiadas (véase la patente de EE.UU. 5.591.624). Los vectores de retrovirus pueden construirse para integración específica de sitio en ADN de la célula huésped mediante incorporación de una enzima integrasa quimérica dentro de la partícula retroviral (véase el documento WO 96/37626). Es preferible que el vector viral recombinante sea un virus recombinante de replicación defectiva.

Las líneas celulares de empaquetado adecuadas para usar con los vectores de retrovirus descritos anteriormente se conocen bien en la técnica, se preparan fácilmente (véanse los documentos WO 95/30763 y WO 92/05266), y pueden usarse para crear líneas celulares productoras (también llamadas líneas celulares de vector o "VCL") para la producción de partículas de vectores recombinantes. Preferiblemente, las líneas celulares de envasado se preparan a partir de células parentales humanas (por ejemplo células HT1080) o líneas celulares parentales de visón, lo que elimina la inactivación en suero humano.

Los retrovirus preferidos para la construcción de vectores de terapia génica retrovirales incluyen Virus de la Leucosis Aviar, Virus de la Leucemia Bovina, Virus de la Leucemia Murina, Virus que Induce Focos en Células de Visón, Virus del Sarcoma Murino, Virus de Reticuloendoteliosis y Virus del Sarcoma de Rous. Los Virus de Leucemia Murina particularmente preferidos incluyen 4070A y 1504A (Hartley y Rowe (1976) J. Virol. 19: 19-25), Abelson (ATCC Nº VR-999), Friend (ATCC Nº VR-245), Graffi, Gross (ATCC Nº VR-590), Kirsten, Virus del Sarcoma de Harvey y Rauscher (ATCC Nº VR-998) y Virus de la Leucemia Murina de Moloney (ATCC Nº VR-190). Dichos retrovirus pueden obtenerse de depósitos o colecciones tales como la American Type Culture Collection ("ATCC") en Rockville, Maryland o aislarse a partir de fuentes conocidas usando técnicas disponibles comúnmente.

Los vectores de terapia génica retroviral conocidos ejemplares que pueden emplearse en esta invención incluyen los que se describen en las solicitudes de patente GB 2200651, EP 0415731, EP 0345242, EP 0334301, WO 89/02468; WO 89/05349, WO 89/09271, WO 90/02806, WO 90/07936, WO 94/03622, WO 93/25698, WO 93/25234, WO 93/11230, WO 93/10218, WO 91/02805, WO 91/02825, WO 95/07994, US 5.219.740, US 4.405.712, US 4.861.719, US 4.980.289, US 4.777.127, US 5.591.624. Véase también Vile (1993) Cancer Res 53: 3860-3864; Vile (1993) Cancer Res 53: 962-967; Ram (1993) Cancer Res 53 (1993) 83-88; Takamiya (1992) J Neurosci Res 33: 493-503; Baba (1993) J Neurosurg 79: 729-735; Mann (1983) Cell 33: 153; Cane (1984) Proc Natl Acad Sci 81: 6349; y Miller (1990) Human Gene Therapy 1.

Los vectores de terapia génica de adenovirus humanos también se conocen en la técnica y pueden emplearse en esta invención. Véase, por ejemplo, Berkner (1988) Biotechniques 6: 616 y Rosenfeld (1991) Science 252: 431, y documentos WO 93/07283, WO 93/06223, y WO 93/07282. Los vectores de terapia génica de adenovirus conocidos ejemplares empleables en esta invención incluyen los que se describen en los documentos mencionados anteriormente y en los documentos WO 94/12649, WO 93/03769, WO 93/19191, WO 94/28938, WO 95/11984, WO 95/00655, WO 95/27071, WO 95/29993, WO 95/34671, WO 96/05320, WO 94/08026, WO 94/11506, WO 93/06223, WO 94/24299, WO 95/14102, WO 95/24297, WO 95/02697, WO 94/28152, WO 94/25299, WO 95/09241, WO 95/25807, WO 95/05835, WO 94/18922 y WO 95/09654. Alternativamente, puede emplearse la administración de ADN unido a adenovirus inactivados como se describe en Curiel (1992) Hum. Gene Ther. 3: 147-154. Los vehículos de administración de genes de la invención también incluyen vectores de virus asociados a adenovirus (AAV). Ejemplos principales y preferidos de tales vectores para usar en esta invención son los vectores basados en AAV-2 descritos en Srivastava, WO 93/09239. Los vectores AAV más preferidos, comprenden las dos repeticiones terminales invertidas de AAV en las que se modifican las secuencias D nativas mediante sustitución de nucleótidos, de modo que al menos 5 nucleótidos nativos y hasta 18 nucleótidos naturales, preferentemente al menos 10 nucleótidos naturales y hasta 18 nucleótidos nativos, más preferentemente 10 nucleótidos nativos se conservan y los restantes nucleótidos de la secuencia D se delecionan o se sustituyen con nucleótidos no nativos. Las secuencias D nativas de las repeticiones terminales invertidas de AAV son secuencias de 20 nucleótidos consecutivos en cada repetición terminal invertida de AAV (es decir, solamente existe una secuencia en cada extremo) que no están implicadas en la formación de HP. El nucleótido de sustitución no nativo puede ser cualquier nucleótido diferente del nucleótido encontrado en la secuencia D nativa en la misma posición. Otros vectores de AAV ejemplares que pueden emplearse son pWP-19, pWN-1 ambos descritos en Nahreini (1993) Gene 124: 257-262. Otro ejemplo de un vector de AAV tal es psub201 (véase Samulski (1987) J. Virol. 61: 3096). Otro vector de AAV ejemplar es el vector IRT Doble-D. La construcción del vector ITR Doble D se describe en la patente de Estados Unidos Nº 5.478.745. Aún otros vectores son aquellos descritos en la patente de Estados Unidos Nº 4.797.368 de Carter y en la patente de Estados Unidos 5.139.941 de Muzyczka, en la patente de Estados Unidos 5.474.935 de Chartejee y WO94/282157 de Kotin. Todavía un ejemplo adicional de un vector de AAV empleable en esta invención es SSV9AFABTKneo, que contiene el potenciador AFP y el promotor de albúmina y dirige la expresión de forma

predominante en el hígado. Su estructura y su construcción se describen en Su (1996) Human Gene Therapy 7: 463-470. En los documentos US 5.354.678, US 5.173.414, US 5.139.941, y US 5.252.479 se describen vectores de terapia génica de AAV adicionales.

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

15 También se contemplan vectores de terapia génica de virus alfa que pueden emplearse en esta invención. Los vectores de virus alfa preferidos son los vectores de los virus Sindbis. Togavirus, virus Semliki Forest (ATCC VR-67, ATCC VR-1247), virus Middleberg (ATCC VR-370), virus Ross River (ATCC VR-373; ATCC VR-1246), virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR923; ATCC VR-1250; ATCC VR-1249; ATCC VR-532), y aquellos descritos en las patentes de Estados Unidos 5.091.309, 5.217.879, y en el documento WO92/10578. Más particularmente, aquellos vectores de virus alfa descritos en el documento US N° de serie 08/405.627, presentado el 20 15 de marzo de 1995, documentos WO94/21792, WO92/10578, WO95/07994, US 5.091309 y US 5.217.879 son empleables. Tales virus alfa pueden obtenerse a partir de depósitos o de colecciones tales como la ATCC en Rockville, Maryland o aislarse a partir de fuentes conocidas usando técnicas disponibles comúnmente. Preferentemente, se usan vectores de virus alfa con toxicidad reducida (véase documento USSN 08/679640).

25 Los sistemas de vectores de ADN tales como sistemas de expresión en capas eucariotas también son útiles para expresar los ácidos nucleicos de la invención. Véase el documento WO95/07994 para una descripción detallada de los sistemas de expresión en capas eucariotas. Preferiblemente, los sistemas de expresión en capas eucariotas de la invención se obtienen de vectores de virus alfa y lo más preferiblemente de vectores virales de Sindbis.

30 Otros vectores virales adecuados para usar en la presente invención incluyen aquellos derivados de poliovirus, por ejemplo ATCC VR-58 y los que se describen en Evans, Nature 339 (1989) 385 y Sabin (1973) J. Biol. Standardization 1: 115; rinovirus, por ejemplo ATCC VR-1110 y los que se describen en el documento Arnold (1990) J Cell Blochem L401; poxvirus tales como poxvirus de canario o virus vaccinia, por ejemplo ATCC VR-111 y ATCC 35 VR-2010 y aquellos que se describen en el documento Fisher-Hoch (1989) Proc. Natl Acad Sci 86: 317; Flexner (1989) Ann NY Acad Sci 569: 86, Flexner (1990) Vaccine 8: 17; en documentos US 4.603.112 y US 4.769.330 y en el documento WO89/01973; virus SV40, por ejemplo ATCC VR-305 y aquellos descritos en los documentos Mulligan (1979) Nature 277: 108 y Madzak (1992) J Gen Virol 73: 1533; virus de la gripe, por ejemplo ATCC VR-797 y virus de la gripe recombinantes preparados empleando técnicas genéticas inversas como se describen en el documento 40 US 5.166.057 y en Enami (1990) Proc Natl Acad Sci 87: 3802-3805; Enami y Palese (1991) J Virol 65: 2711-2713 y Luytjes (1989) Cell 59: 110, (véase también McMichael (1983) NEJ Med 309: 13, y Yap (1978) Nature 273: 238 y Nature (1979) 277: 108); virus de la inmunodeficiencia humana como se describe en el documento EP-0386882 y en Buchschacher (1992) J. Virol. 66: 2731, virus del sarampión, por ejemplo ATCC VR-67 y VR-1247 y aquellos descritos en el documento EP-0440219; virus Aura, por ejemplo ATCC VR-368; virus Bebaru, por ejemplo ATCC VR- 45 600 y ATCC VR-1240; virus Cabassou, por ejemplo ATCC VR-922; virus Chikungunya, por ejemplo ATCC VR-64 y ATCC VR-1241; virus Fort Morgan, por ejemplo ATCC VR-924; virus Getah, por ejemplo ATCC VR-369 y ATCC VR-1243; virus Kyzylgach, por ejemplo ATCC VR-927; virus Mayaro, por ejemplo ATCC VR-66; virus Mucambo, por ejemplo ATCC VR-580 y ATCC VR-1244; virus Ndumu, por ejemplo ATCC VR-371; virus Pixuna, por ejemplo ATCC VR-372 y ATCC VR-1245; virus Tonate, por ejemplo ATCC VR-925; virus Trinita, por ejemplo ATCC VR-469; virus 50 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 que se describen en el documento Hamre (1966) Proc Soc Exp Biol Med 121: 190.

55 La administración de las composiciones de esta invención dentro de las células no se limita a los vectores virales mencionados anteriormente. Pueden emplearse 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 inactivados en solitario, por ejemplo US N° de serie 08/366.787, presentada el 30 de diciembre de 1994 y Curriel (1992) Hum Gene Ther 3: 147-154, ADN unido a ligando, por ejemplo véase el documento Wu (1989) J Biol 60 Chem 264: 16985-16987, células de vehículos para la administración de células eucariotas, por ejemplo véase US N° de serie 08/240.030, presentada el 9 de mayo, 1994, y US N° de serie 08/404.796, deposición de materiales de hidrogel fotopolimerizado, pistola de partículas de transferencia génica de manejo manual, como se describe en la patente de Estados Unidos 5.149.655, radiación ionizante como se describe en el documento US5.206.152 y en el documento WO92/11033, neutralización de carga nucleica o condensación con membranas celulares. Se describen

enfoques adicionales en el documento Philip (1994) Mol Cell Biol 14: 2411-2418 y en Woffendin (1994) Proc Natl Acad Sci 91: 1581-1585.

5 Puede emplearse transferencia génica mediada por partículas, por ejemplo véase documento de EE.UU. N° de serie 60/023.867. Brevemente, la secuencia puede insertarse dentro de vectores convencionales que contienen secuencias de control convencionales para alto nivel de expresión, y después incubarse con moléculas de transferencia génica sintética tales como cationes de unión a ADN polimérico tales como polilisina, protamina, y albúmina, unidos a ligandos dirigidos a células tales como asialoorosomucoide, como se describe en Wu & Wu (1987) J. Biol. Chem. 262: 4429-4432, insulina como se describe en Hucked (1990) Biochem Pharmacol 40: 253-263, galactosa como se describe en Plank (1992) Bioconjugate Chem 3: 533-539, lactosa o transferrina.

10 También puede emplearse ADN desnudo para transformar una célula huésped. Los procedimientos de introducción de ADN desnudo ejemplares se describen en el documento WO 90/11092 y en el documento US 5.580.859. La eficiencia de la captación puede mejorarse usando perlas de látex biodegradables. Las perlas de látex recubiertas de ADN se transportan eficientemente dentro de células después de iniciación de endocitosis mediante las perlas. El procedimiento puede mejorarse adicionalmente mediante tratamiento de las perlas para aumentar la hidrofobicidad y facilitar de este modo la alteración del endosoma y la liberación del ADN al citoplasma.

15 Los liposomas que pueden actuar como vehículos de suministro de genes se describen en los documentos U.S. 5.422.120, WO95/13796, WO94/23697, WO91/14445 y EP-524.968. Como se describe en el documento USSN. 60/023.867, sobre el suministro no viral, las secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido pueden insertarse en vectores convencionales que contienen secuencias de control convencionales para un alto nivel de expresión y después pueden incubarse con moléculas de transferencia de genes sintéticas tales como cationes de unión a ADN polimérico, tales como polilisina, protamina y albúmina, unidos a ligandos dirigidos a células tales como asialoorosomucoide, insulina, galactosa, lactosa o transferrina. Otros sistemas de suministro incluyen el uso de liposomas para encapsular ADN que comprende el gen bajo el control de diversos promotores específicos de tejido o activos de forma ubicua. Administración convencional no viral adicional adecuada para usar incluye sistemas de suministro mecánico tales como el enfoque descrito en el documento Woffendin y col. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(24): 11581-11585. Además, la secuencia codificante y el producto de la expresión de tal secuencia codificante puede administrarse a través de la deposición de materiales de hidrogel fotopolimerizados. Otros procedimientos convencionales para la administración de genes que pueden usarse para administrar la secuencia codificante incluyen, por ejemplo, uso de pistola de partículas de transferencia de genes de uso manual, como se describe en el documento U.S. 5.149.655; uso de radiación ionizante para activar un gen transferido, como se describe en los documentos U.S. 5.206.152 y WO92/11033.

20 Los vehículos de administración de genes policatiónicos y de liposomas ejemplares son aquellos descritos en los documentos US 5.422.120 y 4.762.915; en los documentos WO95/13796; WO94/23697 y WO91/1444; 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.

25 Una composición de polinucleótidos puede comprender una cantidad terapéuticamente efectiva de un vehículo de terapia génica, como se ha definido el término anteriormente. Para los fines de la presente invención, una dosis eficaz será de aproximadamente 0,01 mg/kg a 50 mg/kg o de 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de las construcciones de ADN en el individuo al que se administran.

### Procedimientos de Administración

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

35 La administración directa de las composiciones se conseguirá generalmente mediante inyección, bien por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o bien intramuscular o se administrarán en el espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también pueden administrarse dentro de un tumor o lesión. Otros modos de administración incluyen administración oral y pulmonar, supositorios, y aplicaciones transdérmicas, agujas, y pistolas génicas o inyectores de tipo hypospray. El tratamiento de la dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiples.

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

Generalmente, la administración de ácidos nucleicos para aplicaciones *ex vivo* e *in vitro* puede realizarse mediante los siguientes procedimientos, por ejemplo, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, condensación de protoplastos, electroporación, encapsulación del/de los polinucleótido(s) en liposomas, y microinyección directa de ADN dentro de los núcleos, todo bien conocido en la técnica.

### Composiciones farmacéuticas de polinucleótidos y polipéptidos

Además de los vehículos y sales farmacéuticamente aceptables descritos anteriormente, pueden usarse los siguientes agentes adicionales con composiciones de polinucleótidos y/o polipéptidos.

#### A. Polipéptidos.

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

#### B. Hormonas, Vitaminas, etc.

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

#### C. Polialquilenos, Polisacáridos, etc.

Además, puede incluirse polialquilenoglicol con los polinucleótidos o polipéptidos deseados. En una realización preferida, el polialquilenoglicol es polietilenglicol. Además, pueden incluirse mono-, di- o polisacáridos. En una realización preferida de este aspecto, el polisacárido es dextrano o DEAE-dextrano. También, quitosano y poli(lacturo-co-glicólido).

#### D. Lípidos y Liposomas.

El polinucleótido o polipéptido deseado también puede encapsularse en lípidos o envasarse en liposomas antes de la administración al sujeto o a células obtenidas del mismo.

La encapsulación en lípidos se realiza generalmente usando liposomas que son capaces de unirse o atrapar de forma estable y conservar el ácido nucleico. La proporción de polinucleótido o polipéptido condensado para la preparación de lípidos puede variar pero generalmente será de aproximadamente 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, véase el documento Hug y Sleight (1991) *Biochim, Biophys. Acta* 1097: 1-17; Straubinger (1983) *Meth. Enzymol.* 101: 512-527.

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

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 Felgner referido anteriormente). Otros liposomas disponibles en el mercado incluyen transfectace (DDAB/DOPE) y DOTA/DOPE (Boehringer). Otros liposomas catiónicos pueden prepararse a partir de materiales fácilmente disponibles usando técnicas bien conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo Szoka (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4194-4198; documento WO90/11092 para una descripción de la síntesis de liposomas de DOTAP (1,2-bis(oleiloxi)-3-(trimetilamonio)propano).

De forma similar, los liposomas aniónicos y neutros están fácilmente disponibles, tales como de Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL) o pueden prepararse fácilmente usando materiales fácilmente disponibles. Tales materiales incluyen fosfatidilcolina, colesterol, fosfatidiletanolamina, dioleilfosfatidilcolina (DOPC), dioleilfosfatidilglicerol (DOPG), dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), entre otros. Estos materiales también pueden mezclarse con los materiales de partida DOTMA y DOTAP en proporciones apropiadas. Los procedimientos para preparar liposomas usando estos materiales se conocen bien en la técnica.

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 los documentos Straubinger (1983) *Meth. Immunol.* 101: 512-527; Szoka (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4194-4198; Papahadjopoulos (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 394: 483; Wilson (1979) *Cell* 17: 77); Deamer & Bangham (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 443: 629; Ostro (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76: 836; Fraley (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3348); Enoch & Strittmatter (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 145; Fraley (1980) *J. Biol. Chem.* (1980) 255: 10431; Szoka & Papahadjopoulos (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 145; y Schaefer-Ridder (1982) *Science* 215: 166.

#### E. Lipoproteínas

Además, pueden incluirse lipoproteínas con el polinucleótido o polipéptido a suministrar. Los ejemplos de lipoproteínas a utilizar incluyen: quilomicrones, HDL, IDL, LDL y VLDL. También pueden usarse mutantes, fragmentos o condensaciones de estas proteínas. Además, pueden usarse modificaciones de lipoproteínas que se dan en la naturaleza, tales como LDL acetilada. Estas lipoproteínas pueden dirigir la administración de polinucleótidos a células que expresan receptores de lipoproteínas. Preferiblemente, si se incluyen lipoproteínas con el polinucleótido a administrarse, no se incluye ningún otro ligando objetivo en la composición.

Las lipoproteínas de origen natural comprenden un lípido y una porción proteica. La porción proteica se conoce como apoproteínas. Actualmente, se han aislado e identificado las apoproteínas A, B, C, D y E. Al menos dos de éstas contienen varias proteínas, denominadas mediante números romanos AI, AII, AIV; CI, CII, CIII.

La lipoproteína A puede comprender más de una apoproteína. Por ejemplo, los quilomicrones que se dan en la naturaleza están constituidos por A, B, C y E, a lo largo del tiempo estas lipoproteínas pierden A y adquieren apoproteínas C y E. VLDL comprende apoproteínas A, B, C y E, LDL comprende la apoproteína B; y HDL comprende las apoproteínas A, C y E.

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

Las lipoproteínas contienen diversos lípidos incluyendo, triglicéridos, colesterol (libre y en forma de ésteres) y fosfolípidos. La composición de los lípidos varía en las lipoproteínas que se dan en la naturaleza. Por ejemplo, los quilomicrones comprenden principalmente triglicéridos. Una descripción más detallada del contenido de lípidos de las lipoproteínas que se dan en la naturaleza puede encontrarse, por ejemplo, en el documento *Meth. Enzymol.* 128 (1986). La composición de los lípidos se selecciona para ayudar en la conformación de la apoproteína para la actividad de unión al receptor. La composición de lípidos también puede seleccionarse para facilitar la interacción hidrófoba y la asociación con la molécula de unión al polinucleótido.

Las lipoproteínas de origen natural pueden aislarse a partir del suero mediante ultracentrifugación, por ejemplo. Tales procedimientos se describen en *Meth Enzymol* (referido anteriormente); Pitas (1980) *J. Biochem.* 255: 5454-5460 y Mahey (1979) *J Clin. Invest* 64: 743-750.

Las lipoproteínas también pueden producirse mediante procedimientos *in vitro* o recombinantes mediante expresión de los genes de la apoproteína en una célula huésped deseada. Véase por ejemplo, el documento Atkinson (1986) *Annu Rev Biophys Chem* 15: 403 y Radding (1958) *Biochim Biophys Acta* 30: 443.

Las lipoproteínas pueden además adquirirse de proveedores comerciales, tales como Biomedical Technologies, Inc., Stoughton, Massachusetts, USA.

Puede encontrarse descripción adicional de las lipoproteínas en el documento Zuckermann y col., aplicación PCT N° US97/14465.

#### F. Agentes policatiónicos.

Los agentes policatiónicos pueden incluirse, con o sin lipoproteína, en una composición con el polinucleótido o polipéptido a administrarse deseado.

Los agentes policatiónicos, típicamente, muestran una carga neta positiva a un pH pertinente fisiológico y son capaces de neutralizar la carga eléctrica de ácidos nucleicos para facilitar la administración a una ubicación deseada. Estos agentes tienen tanto aplicaciones *in vitro*, *ex vivo* como *in vivo*. Los agentes policatiónicos pueden usarse para administrar ácidos nucleicos a un sujeto vivo por vía intramuscular, por vía subcutánea, etc.

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 unión al ADN, proteínas cromosómicas no histonas, proteínas de la envuelta a partir de virus de ADN tales como (X174, los factores transcripcionales también contienen dominios que se unen al ADN y por lo tanto pueden ser útiles como agentes de condensación de ácidos nucleicos. 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, CREP y TFIID contienen dominios básicos que se unen a secuencias de ADN.

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

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

Agentes policatiónicos sintéticos

Los agentes policatiónicos sintéticos que son útiles incluyen, por ejemplo, DEAE-dextrano, polibreno, lipofectin®, y lipofectAMINE® que son monómeros que forman complejos policatiónicos cuando se combinan con polinucleótidos o polipéptidos.

## Ensayos de Inmunodiagnóstico

Los antígenos de Neisseria de la invención pueden usarse en inmunoensayos para detectar niveles de anticuerpos (o, por el contrario, pueden usarse anticuerpos anti-Neisseria para detectar niveles de antígenos). Los inmunoensayos basados en antígenos recombinantes, bien definidos, pueden desarrollarse para sustituir procedimientos de diagnóstico invasivos. Se pueden detectar anticuerpos para proteínas de Neisseria en muestras biológicas, incluyen por ejemplo, muestras de sangre o de suero. El diseño de los inmunoensayos está sometido a una gran cantidad de variación, y se conoce una variedad de estos en la técnica. Los protocolos para el inmunoensayo pueden basarse, por ejemplo, en competición, o en reacción directa, o en ensayos de tipo sándwich. Los protocolos pueden además, por ejemplo, usar soportes sólidos, o pueden ser mediante inmunoprecipitación. La mayoría de los ensayos implican el uso de un anticuerpo o polipéptido marcado; las marcas pueden ser, por ejemplo, fluorescentes, quimioluminiscentes, radioactivas o moléculas de tinte. Los ensayos que amplifican las señales a partir de la sonda también se conocen; ejemplos de los cuales son ensayos que utilizan biotina y avidina, e inmunoensayos marcados con enzimas, tales como ensayos ELISA.

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

## Hibridación de Ácidos Nucleicos

"Hibridación" se refiere a la asociación de dos secuencias de ácidos nucleicos entre sí mediante puentes de hidrógeno. Típicamente, una secuencia se fijará a un soporte sólido y la otra estará libre en solución. Después, las dos secuencias se situarán en contacto entre sí en condiciones que favorecen la formación de puentes de hidrógeno. Los factores que afectan a esta formación de puentes incluyen: el tipo y el volumen del disolvente, la temperatura de la reacción; el tiempo de hibridación; la agitación; agentes para bloquear la unión no específica de la secuencia de fase líquida al soporte sólido (reactivo de Denhardt o BLOTTO); concentración de las secuencias; uso de compuestos para aumentar la tasa de asociación de secuencias (sulfato de dextrano o polietilenglicol); y la rigurosidad de las condiciones de lavado después de la hibridación. Véase el documento Sambrook y col. [referido anteriormente] Volumen 2, capítulo 9, páginas 9.47 a 9.57.

"Rigurosidad" se refiere a condiciones en una reacción de hibridación que favorecen la asociación de secuencias muy similares por encima de la de secuencias que son diferentes. Por ejemplo, la combinación de temperatura y concentración de sales debería seleccionarse de modo que esté aproximadamente 120 a 200° C por debajo de la T<sub>m</sub> calculada para el híbrido estudiado. La temperatura y las condiciones de las sales pueden determinarse a menudo de forma empírica en experimentos previos en los que muestras del ADN genómico inmovilizadas en filtros se hibridan con la secuencia de interés y después se lavan en condiciones de diferentes rigurosidades. Véase Sambrook y col. en la página 9.50.

Las variables a considerar cuando se realiza, por ejemplo, una inmunotransferencia de Southern son (1) la complejidad del ADN que se inmunotransfiere y (2) la homología entre la sonda y las secuencias que se detectan. La cantidad total del/de los fragmento(s) a estudiarse puede variar en una magnitud de 10, entre 0,1 y 10 µg para un plásmido o fago digerido a 10<sup>-9</sup> a 10<sup>-8</sup> g a partir de una única copia del gen en un genoma eucariota altamente complejo. Para polinucleótidos de menor complejidad, pueden usarse tiempos de inmunotransferencia, de hibridación, y de exposición sustancialmente más cortos, una menor cantidad de polinucleótidos de partida, y



actividad específica menor de las sondas. Por ejemplo, un gen de levadura de copia única puede detectarse con un tiempo de exposición de solamente 1 hora empezando con 1 µg de ADN de levadura, inmunotransfiriendo durante dos horas, e hibridando durante 4-8 horas con una sonda de 10<sup>8</sup> cpm/µg. Para un gen de mamífero de copia única un enfoque conservativo debería comenzar con 10 µg de ADN, inmunotransferir durante toda una noche, e hibridar durante toda una noche en presencia de sulfato de dextrano al 10% usando una sonda de más de 10<sup>8</sup> cpm/µg, dando como resultado un tiempo de exposición de ~ 24 horas.

Varios factores pueden afectar a la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) de un híbrido de ADN-ADN entre la sonda y el fragmento de interés, y consecuentemente, las condiciones apropiadas para la hibridación y el lavado. En muchos casos la sonda no es homóloga al 100% con el fragmento. Otras variables que se encuentran comúnmente incluyen la longitud y el contenido de G+C total de las secuencias de hibridación y la fuerza iónica y el contenido de formamida del tampón de hibridación. Los efectos de estos factores pueden relacionarse aproximadamente mediante una única ecuación:

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

donde Ci es la concentración de sales (iones monovalentes) y n es la longitud del híbrido en pares de bases (modificada ligeramente de Meinkoth & Wahi (1984) Anal. Biochem. 138: 267-284).

Al diseñar un experimento de hibridación, pueden alterarse convenientemente algunos factores que afectan a la hibridación del ácido nucleico. La temperatura de la hibridación y de los lavados y la concentración de sales durante el lavado son lo más sencillo de ajustar. Según la temperatura de la hibridación aumenta (es decir, la rigurosidad), llega a ser menos probable que ocurra la hibridación entre cadenas que son no homólogas, y como un resultado, el fondo disminuye. Si la sonda radiomarcada no es completamente homóloga con el fragmento inmovilizado (como es frecuentemente el caso en familias de genes y en experimentos de hibridación interespecíficos), debe reducirse la temperatura de hibridación y el fondo aumentará. La temperatura de los lavados afecta a la intensidad de la banda de hibridación y al grado de fondo de forma similar. La rigurosidad de los lavados también aumenta disminuyendo la concentración de sales.

En general, las temperaturas de hibridación adecuadas en presencia de formamida al 50% son 42°C para una sonda que es del 95 al 100% homóloga con el fragmento objetivo, 37°C para homología del 90% al 95%, y 32°C para el 85 al 90% de homología. Para homologías inferiores, se rebajaría el contenido de formamida y la temperatura se ajustaría de acuerdo con ello, usando la ecuación anterior. Si la homología entre la sonda y el fragmento objetivo no se conoce, el enfoque más sencillo es comenzar tanto con condiciones de hibridación como con condiciones de lavado que sean no rigurosas. Si se observan bandas no específicas o un fondo alto después de la autorradiografía, el filtro puede lavarse con rigurosidad alta y volverse a exponer. Si el tiempo requerido para la exposición hace este enfoque poco práctico, deben ensayarse en paralelo varias rigurosidades de hibridación y/o de lavado.

#### Ensayos de Sonda de Ácido Nucleico

Procedimientos tales como PCR, ensayos de sonda de ADN ramificado, o técnicas de inmunotransferencia utilizando sondas de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención pueden determinar la presencia de ADNc o ARNm. Se dice que una sonda "hibrida" con una secuencia de la invención si puede formar un dúplex o complejo de doble cadena, que es lo suficientemente estable para detectarse.

Las sondas de ácido nucleico hibridarán con las secuencias de nucleótidos de Neisseria de la invención (incluyendo cadenas sentido y antisentido). Aunque muchas secuencias de nucleótidos diferentes codificarán la secuencia de aminoácidos, se prefiere la secuencia de Neisseria nativa ya que es la verdadera secuencia presente en las células. El ARNm representa una secuencia codificante y de este modo una sonda sería complementaria con la secuencia codificante; el ADNc de cadena sencilla es complementario al ARNm, y por tanto una sonda de ADNc sería complementaria con la secuencia no codificante.

La secuencia de la sonda no necesita ser idéntica a la secuencia de Neisseria (o su complemento)- algunas variaciones en la secuencia y en la longitud pueden conducir a sensibilidad del ensayo incrementada si la sonda del ácido nucleico puede formar un dúplex con nucleótidos objetivo, que puede detectarse. Además, la sonda de ácido nucleico puede incluir nucleótidos adicionales para estabilizar el dúplex formado. Una secuencia de Neisseria adicional también puede ser útil como una marca para detectar el dúplex formado. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos no complementaria puede unirse en el extremo 5' de la sonda, con el resto de la sonda siendo complementario a una secuencia de Neisseria. Alternativamente, pueden introducirse dentro de la sonda bases no complementarias o secuencias más largas, siempre que la secuencia de la sonda tenga la suficiente complementariedad con la secuencia de Neisseria para hibridar con ella y formar de este modo un dúplex que pueda detectarse.

La longitud y secuencia exacta de la sonda dependerán de las condiciones de hibridación, tales como

temperatura, condiciones salinas y similares. Por ejemplo, para aplicaciones diagnósticas, dependiendo de la complejidad de la secuencia del analito, la sonda de ácido nucleico contiene normalmente al menos 10-20 nucleótidos, preferentemente 15-25, y más preferentemente al menos 30 nucleótidos, aunque puede ser más corta que esto. Los cebadores cortos requieren generalmente temperaturas más bajas para formar complejos híbridos suficientemente estables con la plantilla.

Pueden producirse sondas mediante procedimientos sintéticos, tales como el procedimiento del triéster de Matteucci y col. [J. Am. Chem. Soc. (1981) 103: 3185], o de acuerdo con Urdea y col. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80: 7461], o usando sintetizadores de oligonucleótidos automatizados disponibles comercialmente.

La naturaleza química de la sonda puede seleccionarse de acuerdo con la preferencia. Para algunas aplicaciones, son apropiados ADN o ARN. Para otras aplicaciones, pueden incorporarse modificaciones por ejemplo modificaciones en la estructura, tales como fosforotioatos o metilfosfonatos, pueden usarse para aumentar la semivida *in vivo*, alterar la afinidad por ARN, aumentar la resistencia a nucleasa, etc. [por ejemplo véase Agrawal y Lyer (1995) Curr Opin Biotechnol 6: 12-19; Agrawal (1996) TIBTECH 14: 376-387]; también pueden usarse análogos tales como ácidos péptidonucleicos [por ejemplo véase el documento Corey (1997) TIBTECH 15: 224-229, Buchardt y col. (1993) TIBTECH 11: 384-386].

Un ejemplo de un ensayo de hibridación de nucleótidos se describe por Urdea y col. en la solicitud de patente internacional WO92/02526 [véase también patente de Estados Unidos 5.124.246].

Alternativamente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es otro procedimiento bien conocido para detectar pequeñas cantidades de ácidos nucleicos objetivo. El ensayo se describe en: Mullis y col [Meth. Enzymol. (1987) 155: 335-350]; patente de Estados Unidos 4.683.195; y patente de Estados Unidos 4.683.202. Dos nucleótidos "cebadores" hibridan con los ácidos nucleicos diana y se usan para iniciar la reacción. Los cebadores pueden comprender secuencia que no hibrida con la secuencia del objetivo de amplificación (o con su complemento) para ayudar a la estabilidad del dúplex o, por ejemplo, para incorporar un sitio de restricción adecuado. Típicamente, dicha secuencia flanqueará a la secuencia de *Neisseria* deseada.

Una polimerasa termoestable crea copias de ácidos nucleicos objetivo a partir de los cebadores usando los ácidos nucleicos objetivo originales como una plantilla. Después de generarse una cantidad umbral de ácidos nucleicos diana mediante la polimerasa, pueden detectarse mediante procedimientos más convencionales, tales como inmunotransferencias de Southern. Cuando se usa el procedimiento de inmunotransferencia de Southern, la sonda marcada hibridará con la secuencia de *Neisseria* (o su complemento).

Además, pueden detectarse ARNm o ADNc mediante técnicas de inmunotransferencia tradicionales descritas en el documento Sambrook y col. [referido anteriormente]. El ARNm, o el ADNc generado a partir de ARNm usando una enzima polimerasa, pueden purificarse y separarse usando electroforesis en gel. Los ácidos nucleicos en el gel se inmunotransfieren después a un soporte sólido, tal como nitrocelulosa. El soporte sólido se expone a una sonda marcada y después se lava para eliminar la sonda sin hibridar. A continuación, se detectan los dúplex que contienen la sonda marcada. Típicamente, la sonda se marca con un resto radioactivo.

#### EJEMPLO

El ejemplo describe secuencias de ácidos nucleicos que han sido identificadas en *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* con sus productos de translación respectivos y putativos. No todas las secuencias de ácidos nucleicos están completas, es decir, codifican menos que la proteína del tipo salvaje de longitud completa.

El ejemplo está generalmente en el formato siguiente:

- una secuencia de nucleótidos que se ha identificado en *N. meningitidis*
- el supuesto producto de traducción de dicha secuencia de *N. meningitidis*
- un análisis computerizado de dicho producto de traducción basado en comparaciones con bases de datos
- una secuencia de nucleótidos correspondiente identificada a partir de *N. gonorrhoeae*
- el supuesto producto de traducción de dicha secuencia de *N. gonorrhoeae*
- una comparación del porcentaje de identidad entre el producto de traducción de la secuencia de *N. meningitidis* y el de la secuencia de *N. gonorrhoeae*
- una secuencia de nucleótidos correspondiente identificada del serogrupo A de *N. meningitidis*
- el supuesto producto de traducción de dicha secuencia del serogrupo A de *N. meningitidis*
- una comparación del porcentaje de identidad entre el producto de traducción de la secuencia de *N. meningitidis* y el de la secuencia de *N. gonorrhoeae*
- una descripción de las características de la proteína que indican que puede ser adecuadamente antigénica o inmunogénica.

Las comparaciones de secuencia se realizaron en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando los

5 algoritmos BLAST, BLAST2, BLASTn, BLASTp, tBLASTn, BLASTx, y tBLASTx [por ejemplo véase el documento Altschul y col. (1997) Gapped BLAST y PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 2289-3402]. Las búsquedas se realizaron en las siguientes bases de datos: secuencias GenBank+EMBL+DDBJ+PDB no redundantes y secuencias y GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+SPPupdate+PIR no redundantes.

10 Las secuencias de nucleótidos se exploraron en los seis marcos de lectura prediciendo la presencia de dominios hidrófobos usando un algoritmo basado en los estudios estadísticos de Esposti y col. [Critical evaluation of the hydropathy of membrane proteins (1990) *Eur J Biochem* 190: 207-219]. Estos dominios representan potenciales regiones transmembrana o secuencias líderes hidrófobas.

15 Los marcos de lectura abierta se predijeron a partir de secuencias de nucleótidos fragmentadas usando el programa ORFFINDER (NCBI).

Las secuencias de aminoácidos subrayadas indican posibles dominios transmembrana o secuencias líderes en el ORF, de acuerdo con lo predicho con el algoritmo PSORT (<http://www.psорт.nibb.ac.jp>). Los dominios funcionales también se predijeron usando el programa MOTIFS (GCG Wisconsin & PROSITE).

20 Para el siguientes ejemplo: en base a la presencia de una supuesta secuencia líder putativa y/o varios supuestos dominios transmembrana putativos (subrayados con una única línea) en la proteína de gonococos, se predice que las proteínas de *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* y sus respectivos epítomos, podrían ser antígenos útiles o composiciones inmunogénicas para vacunas o diagnósticos.

25 Las técnicas y procedimientos estándar que pueden emplearse con el fin de realizar la invención (por ejemplo utilizando las secuencias descritas para vacunación o propósitos de diagnóstico) se resumieron anteriormente. Este resumen no es una limitación de la invención sino que, más bien, proporciona ejemplos que pueden usarse, pero que no se requieren.

30 En particular, se usaron los siguientes procedimientos para expresar, purificar y caracterizar bioquímicamente a las proteínas de la invención.

#### Preparación de ADN Cromosómico

35 Se cultivó la cepa 2996 de *N. meningitidis* hasta una fase exponencial en 100 ml de medio GC, se recogió mediante centrifugado y se resuspendió en 5 ml de tampón (sacarosa al 20% (p/v), Tris-HCl 50 mM, EDTA 50 mM, pH 8,0). Después de 10 minutos de incubación en hielo, las bacterias se lisaron añadiendo 10 ml de solución de lisis (NaCl 50 mM, Na-Sarkosyl al 1%, 50 mg/ml de proteinasa K) y la suspensión se incubó a 37°C durante 2 horas. Se realizaron 2 extracciones de fenol (equilibrado a pH 8) y una extracción con CHCl<sub>3</sub>/alcohol isoamílico (24:1). El ADN se precipitó mediante la adición de acetato sódico 0,3 M y 2 volúmenes de etanol, y se recogió mediante centrifugación. El sedimento se lavó una vez con etanol a 70% y se redisolvió en 4 ml de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). La concentración de ADN se midió leyendo la DO a 260 nm.

#### 45 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron cebadores de oligonucleótidos sintéticos en base a la secuencia codificante de cada ORF, usando (a) la secuencia de meningococos B cuando estaba disponible o (b) la secuencia de gonococos/meningococos A, adaptada para el uso preferente del codón de los meningococos según sea necesario. Se omitieron los péptidos señal predichos, diseñando los cebadores 5' para la secuencia inmediatamente más adelante en la cadena a partir de la secuencia líder predicha.

50 Para la mayoría de los ORF, los cebadores 5' incluyeron 2 sitios de reconocimiento de enzimas de restricción (*BamHI-NdeI*, *BamHI-NheI*, *EcoRI-NdeI* o *EcoRI-NheI*), dependiendo del patrón de restricción del gen de interés. Los cebadores 3' incluyeron un sitio de restricción *XhoI* o un sitio de restricción *HindIII*. Se estableció este procedimiento con el fin de dirigir la clonación de cada producto de amplificación (correspondiente a cada ORF) en dos sistemas de expresión diferentes: pGEX-KG (usando *BamHI-XhoI*, *BamHI-HindIII*, *EcoRI-XhoI* o *EcoRI-HindIII*) y pET21 b+ (usando *NdeI-XhoI*, *NheI-XhoI*, *NdeI-HindIII* o *NheI-HindIII*).

60

65

	Cola del cebador del extremo 5'	<u>CGCGGATCCCATATG</u>	( <i>Bam</i> HI- <i>Nde</i> I)
5		<u>CGCGGATCCGCTAGC</u> <u>CCGGAATTCTACATAG</u> <u>CCGGAATTCTAGCTAGC</u>	( <i>Bam</i> HI- <i>Nhe</i> I) ( <i>Eco</i> RI- <i>Nde</i> I) ( <i>Eco</i> RI- <i>Nhe</i> I)
	Cola del cebador del extremo 3'	<u>CCCGCTCGAG</u>	( <i>Xho</i> I)
10		<u>CCCGCTCGAG</u>	( <i>Hind</i> III)

15 Para clonar ORF en el vector pGEX-His, los cebadores 5' y 3' contenían sólo un sitio de enzima de restricción (*Eco*RI, *Kpn*I o *Sal*I para los cebadores 5' y *Pst*I, *Xba*I, *Sph*I o *Sal*I para los cebadores 3'). De nuevo se eligieron los sitios de restricción de acuerdo con el patrón de restricción particular del gen (tabla 1).

20	Cola del cebador del extremo 5'	(AAA) <u>AAAGAATTC</u>	( <i>Eco</i> RI)
		(AAA) <u>AAAGGATCC</u>	( <i>Kpn</i> I)
	Cola del cebador del extremo 3'	(AAA) <u>AAACTGCAG</u>	( <i>Pst</i> I)
25		(AAA) <u>AAATCTAGA</u> <u>AAAGCATGC</u>	( <i>Xba</i> I) ( <i>Sph</i> I)
	Cola del cebador del extremo 5' o 3'	<u>AAAAAAGTCGAC</u>	( <i>Sal</i> I)

30 Así como contenían las secuencias de reconocimientos de enzimas de restricción, los cebadores incluyeron nucleótidos que hibridaron con la secuencia a amplificarse. La temperatura de fusión dependió del número y tipo de nucleótidos que hibridaron en el cebador completo, y se determinó para cada cebador usando las fórmulas:

35 
$$T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T) \text{ (excluyendo la cola)}$$

$$T_m = 64,9 + 0,41 (\% \text{ de GC}) - 600/N \text{ (cebador completo)}$$

40 Las temperaturas de fusión de los oligonucleótidos seleccionados eran usualmente de 65-70°C para el oligo completo y de 50-55°C para la región de hibridación sola.

45 La tabla 1 muestra los cebadores en el sentido habitual y en el sentido inverso usados para cada aplicación. En ciertos casos, la secuencia del cebador no se aparea de forma exacta con la secuencia del ORF predicho. Esto es porque cuando las amplificaciones iniciales se llevaron a cabo, las secuencias 5' y/o 3' completas para algunos ORF de meningococo no se conocían. Sin embargo las secuencias correspondientes se han identificado en gonococo o en meningococo A. Así, cuando la secuencia de meningococo B era incompleta o incierta, se usaron las secuencias gonococal o meningococal A como la base para el diseño del cebador. Estas secuencias se alteraron para tener en cuenta la preferencia de codón. Se puede apreciar que, una vez se identifica la secuencia completa, este enfoque no será necesario más.

50 Los oligonucleótidos se sintetizaron usando un Perkin Elmer 394 DNA/RNA Synthesizer, se eluyeron de las columnas en 2 ml de NH<sub>4</sub>OH, y se desprotegieron mediante 5 horas de incubación a 56°C. Los oligos precipitaron mediante adición de acetato de sodio 0,3 M y 2 volúmenes de etanol. Se centrifugaron las muestras y los sedimentos se resuspendieron bien en 100 µl o bien en 1,0 ml de agua. Se determinó la DO<sub>260</sub> usando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda Bio y la concentración se ajustó a 2-10 pmol/µl.

**Amplificación**

60 El protocolo de PCR estándar era de la siguiente manera: se usaron 50-200 ng de ADN genómico como una plantilla en la presencia de 20-40 µM de cada cebador oligonucleótido, solución de dNTP 400-800 µM, tampón de PCR 1x (incluyendo MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM), 2,5 unidades de ADN polimerasa *Taq*I (usando Perkin Elmer AmpliTaq, GIBCO Platinum, ADN polimerasa Pwo, o *Taq* polimerasa Tahara Shuzo). En algunos casos, la PCR se optimizaba mediante la adición de 10 µl de DMSO o 50 µl de betaína 2 M.

65

Después de un inicio con calor (añadiendo la polimerasa durante una incubación preliminar de 3 minutos de la mezcla completa a 95°C), cada muestra sufrió una amplificación de dos etapas. Los 5 primeros ciclos se realizaron usando la temperatura de hibridación que excluyó la cola de las enzimas de restricción del cebador (véase anteriormente). Esto se siguió por 30 ciclos usando la temperatura de hibridación calculada para los oligos de longitud completa. Los ciclos se completaron con una etapa de extensión de 10 minutos a 72°C. Los ciclos estándar fueron como sigue:

	<b>Desnaturalización</b>	<b>Hibridación</b>	<b>Elongación</b>
5 primeros ciclos	30 segundos 95°C	30 segundos 50-55°C	30-60 segundos 72°C
30 últimos ciclos	30 segundos 95°C	30 segundos 65-70°C	30-60 segundos, 72°C

Los tiempos de elongación variaron de acuerdo con la longitud del ORF a amplificarse. Las amplificaciones se realizaron usando bien un sistema Perkin Elmer GeneAmp PCR 9600 o bien un sistema Perkin Elmer GeneAmp PCR 2400. Para comprobar los resultados, se cargó 1/10 del volumen de amplificación en un gel de agarosa a 1-1,5% (p/v) y se comparó el tamaño de cada fragmento amplificado con un marcador de peso molecular de ADN.

El ADN amplificado bien se cargó directamente en un gel de agarosa al 1% o bien se precipitó en primer lugar con etanol y se resuspendió en un volumen adecuado para cargarse en un gel de agarosa al 1,0%. El fragmento de ADN correspondiente a la banda de tamaño correcto se eluyó después y se purificó a partir del gel, usando el kit de Extracción de Gel de Qiagen, siguiendo el protocolo del fabricante. Los fragmentos de ADN se eluyeron en un volumen de 30 µl o 50 µl bien con agua o bien con Tris 10 mM, pH 8,5.

#### **Digestión de los fragmentos de PCR**

El ADN purificado correspondiente al fragmento amplificado se digirió por partida doble con las enzimas de restricción apropiadas para; clonar en pET-21b+ y expresar la proteína como una condensación marcada con His en el extremo C; para clonar en pGEX-KG y expresar la proteína como una condensación GST en el extremo N, y para clonar en pGEX-His y expresar la proteína como una condensación marcada con His-GST en el extremo N.

Cada fragmento de ADN purificado se incubó a 37°C durante de 3 horas a toda una noche con 20 unidades de cada enzima de restricción apropiada (New England Biolabs) en un volumen final de 30 ó 40 µl en presencia del tampón de digestión apropiado. Los fragmentos digeridos se purificaron después usando el kit de purificación QIAquick PCR siguiendo las instrucciones del fabricante y se eluyó en un volumen final de 30 µl o 50 µl bien con agua o bien con Tris 10 mM, pH 8,5. La concentración final de ADN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa cuantitativa (gel al 1,0%) en presencia de un marcador de peso molecular valorado.

#### **Digestión de los vectores de clonación (pET22B, pGEX-KG, pTRC-His A, pET21b+, pGEX-KG, y pGEX-His)**

El vector pGEX-His es un vector pGEX-2T modificado que lleva una región que codifica seis residuos de histidina cadena arriba del sitio de escisión de trombina y que contiene el sitio de clonación múltiple del vector pTRC99 (Pharmacia). Se digirieron por partida doble 10 µg de plásmido con 50 unidades de cada enzima de restricción en 200 µl de volumen de reacción en presencia del tampón apropiado mediante incubación durante toda una noche a 37°C. Después de cargar toda la digestión en un gel de agarosa al 1%, se purificó la banda correspondiente al vector digerido a partir del gel usando el kit de Extracción de Gel QIAquick de Qiagen y el ADN se eluyó en 50 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 8,5. La concentración de ADN se evaluó midiendo la  $DO_{260}$  de la muestra y se ajustó a 50 g/ml. Se usó 1 µl de plásmido para cada procedimiento de clonación.

Se digirieron por partida doble 10 µg de vector plasmídico con 50 unidades de cada enzima de restricción en un volumen de 200 µl con el tampón apropiado durante toda una noche a 37°C. La digestión se cargó en un gel de agarosa al 1% y se purificó la banda correspondiente al vector digerido usando el kit de Extracción de Gel QIAquick de Qiagen. El ADN se eluyó en 50 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 8,5. La concentración de ADN se evaluó midiendo la  $DO_{260}$  de la muestra y la concentración se ajustó a 50 g/ml. Se usó 1 µl de plásmido para cada procedimiento de clonación.

#### **Clonación**

Para algunos ORF, los fragmentos correspondientes a cada ORF, digeridos previamente y purificados, se ligaron en pET22b y pGEX-KG. En un volumen final de 20 µl, una proporción molar de fragmento/vector 3:1 se ligó usando 0,5 µl de T4 ADN ligasa NEB (400 unidades/µl), en presencia del tampón suministrado por el fabricante. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas. En algunos experimentos, la ligazón se realizó usando el "Rapid Ligation Kit" de Boheringer, siguiendo las instrucciones del fabricante.

5 Para introducir el plásmido recombinante en una cepa adecuada, se incubaron 100  $\mu$ l de células competentes DH5 de *E. coli* con la solución de reacción de la ligasa durante 40 minutos en hielo, después a 37°C durante 3 minutos, después, tras añadir 800  $\mu$ l de caldo LB, de nuevo a 37°C durante 20 minutos. Después se centrifugaron las células a velocidad máxima en una microcentrífuga Eppendorf y se resuspendieron a aproximadamente 200  $\mu$ l del sobrenadante. Después se plaqueó la suspensión en ampicilina LB (100 mg/ml).

10 La selección de los clones recombinantes se realizó cultivando 5 colonias seleccionadas al azar durante toda una noche a 37°C bien en 2 ml (clones pGEX o pTC) o bien en 5 ml (clones pET) en caldo LB + 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. Después las células se centrifugaron y el ADN se extrajo usando el kit Qiagen QIAprep Spin Miniprep, siguiendo las instrucciones del fabricante, hasta un volumen final de 30  $\mu$ l. Se digirieron 5  $\mu$ l de cada minipreparación individual (aproximadamente 1 g) bien con *NdeI/XhoI* o bien con *BamHI/XhoI* y la digestión completa se cargó en un gel de agarosa a 1-1,5% (dependiendo del tamaño de inserto esperado), en paralelo con el marcador de peso molecular (ADN Ladder de 1 kb, GIBCO). La selección de los clones positivos se realizó de acuerdo con el tamaño correcto del inserto.

15 Para otros ORF, los fragmentos que corresponden a cada ORF, previamente digeridos y purificados, se ligaron tanto dentro de pET21b+ como dentro de pGEX-KG. Se usó una razón molar de fragmento/vector de 3:1 en un volumen final de 20  $\mu$ l, que incluyó 0,5  $\mu$ l de ligasa de ADN de T4 (400 unidades/ $\mu$ l, NEB) y tampón de ligazón suministrado por el fabricante. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 3 horas. En algunos experimentos, la ligazón se llevó a cabo usando el "Rapid Ligation Kit" de Boehringer y el protocolo del fabricante.

20 El plásmido recombinante se transformó en 100  $\mu$ l de *E. coli* DH5 o HB101 competente incubando la solución de reacción de ligasa y bacteria durante 40 minutos en hielo después a 37°C durante 3 minutos. Esto se siguió por la adición de 800  $\mu$ l de caldo LB e incubación a 37°C durante 20 minutos. Las células se centrifugaron a velocidad máxima en una microcentrífuga de Eppendorf, se resuspendieron en aproximadamente 200  $\mu$ l del sobrenadante y se plaquearon sobre agar de ampicilina LB (100 mg/ml).

25 La selección de clones recombinantes se llevó a cabo cultivando 5 colonias seleccionadas al azar durante toda una noche a 37°C bien en 2 ml (clones pGEX o pTC) o bien en 5 ml (clones pET) en caldo LB + 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. Las células se centrifugaron y el ADN se extrajo usando el kit Qiagen QIAprep Spin Miniprep, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se digirió aproximadamente 1  $\mu$ g de cada minipreparación individual con las enzimas de restricción apropiadas y la digestión se cargó en un gel de agarosa al 1-1,5% (dependiendo del tamaño del inserto esperado), en paralelo con el marcador de peso molecular (Escalera de ADN de 1 kb, GIBCO). Los clones positivos se seleccionaron sobre la base del tamaño del inserto.

30 Los ORF se clonaron en el vector pGEX-HIS, digiriendo por partida doble el producto y ligando en vector digerido de forma similar. Después de clonación, los plásmidos recombinantes se transformaron en el huésped W3110 de *E. coli*. Los clones individuales se cultivaron durante toda una noche a 37°C en caldo LB con ampicilina 50  $\mu$ g/ml.

35 Ciertos ORF pueden clonarse en el vector pGEX-HIS usando sitios de clonación *EcoRI-PstI*, o *EcoRI-SalI* o *Sall-PstI*. Después de la clonación, los plásmidos recombinantes pueden introducirse en el huésped W3110 de *E. coli*.

#### 45 **Expresión**

50 Cada ORF clonado en el vector de expresión puede transformarse después en la cepa adecuada para la expresión del producto de proteína recombinante. Se usó 1  $\mu$ l de cada construcción transformando 30  $\mu$ l de BL21 de *E. coli* (vector pGEX), TOP 10 de *E. coli* (vector pTRC) o LB21-DE3 (pET) de *E. coli* como se ha descrito anteriormente. En el caso del vector pGEX-His, se usó la misma cepa de *E. coli* (W3110) para la clonación inicial y la expresión. Se inocularon colonias recombinantes únicas en 2 ml de LB+Amp (100  $\mu$ g/ml), se incubaron a 37°C durante toda una noche, después se diluyeron a 1:30 en 20 ml de LB+Amp (100  $\mu$ g/ml) en matraces de 100 ml, asegurándonos de que la DO<sub>600</sub> variaba entre 0,1 y 0,15. Los matraces se incubaron a 30°C en agitadores de baños de agua giratorios hasta que la DO indicaba un crecimiento exponencial adecuado para la inducción de la expresión (DO de 0,4-0,8 para vectores pET y pTRC; DO 0,8-1 para vectores pGEX y pGEX-His). Para los vectores pET, pTRC y pGEX-His, la expresión de la proteína se indujo mediante adición de IPTG 1 mM, mientras que en el caso del sistema de pGEX la concentración final de IPTG era de 0,2 mM. Después de 3 horas de incubación a 30°C, se comprobó la concentración final de la muestra mediante DO. Para comprobar la expresión, se extrajo 1 ml de cada muestra, se centrifugó en una microcentrífuga, el sedimento se resuspendió en PBS y se analizó mediante SDS-PAGE al 12% con tinción de azul de Coomassie. Toda la muestra se centrifugó a 6.000 g y el sedimento se resuspendió en PBS para uso adicional.

#### 60 **Purificación a gran escala de proteínas de condensación GST**

65 Para algunos ORF, se cultivó una única colonia durante toda una noche a 37°C en placa de agar LB+Amp.

Las bacterias se inocularon en 20 ml de cultivo líquido LB+Amp en un baño de agua con agitación y se cultivaron durante toda la noche. Las bacterias se diluyeron a 1:30 en 600 ml de medio recién preparado y se les dejó crecer a la temperatura óptima (20-37°C) hasta una DO<sub>550</sub> de 0,8-1. Se indujo la expresión de las proteínas con IPTG 0,2 mM seguido por 3 horas de incubación. El cultivo se centrifugó a 8000 rpm a 4°C. El sobrenadante se descartó y el sedimento bacteriano se resuspendió en 7,5 ml de PBS frío. Las células se rompieron mediante sonicación en hielo durante 30 segundos a 40 W usando un sonicador Branson B-15, se congelaron y se descongelaron dos veces y se centrifugaron de nuevo. El sobrenadante se recogió y se mezcló con 150 µl de resina Glutation-Sefarosa 4B (Pharmacia) (previamente lavada con PBS) y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. La muestra se centrifugó a 700 g durante 5 minutos a 4°C. La resina se lavó dos veces con 10 ml de PBS frío durante 10 minutos, se resuspendió en 1 ml de PBS frío, y se cargó en una columna desechable. La resina se lavó dos veces con 2 ml de PBS frío hasta que el flujo a su través alcanzaba una DO<sub>280</sub> de 0,02-0,06. La proteína de condensación GST se eluyó mediante la adición de 700 µl de tampón de elución de glutatión frío 10 mM reducido con glutatión, Tris-HCl 50 mM) y se recogieron las fracciones hasta que la DO<sub>280</sub> era de 0,1. Se cargaron 21 µl de cada fracción en un gel SDS al 12% usando el estándar de peso molecular de SDS-PAGE de Biorad de amplio espectro (M1) (200, 116,25, 97,4, 66,2, 45, 31, 21,5, 14,4, 6,5 kDa) o el marcador Amersham Rainbow Marker (M'') (200, 66, 46, 30, 21,5, 14,3 kDa) como estándares. Como el PM de GST es de 26 kDa, este valor debe añadirse al PM de cada proteína de condensación GST.

Para otros ORF, para cada clon a purificarse como una condensación de GST, se extendió en forma de línea una colonia individual y se cultivó durante toda una noche a 37°C en una placa de agar LB/Amp (100 µg/ml). Se inoculó una colonia aislada de esta placa en 20 ml de medio líquido de LB/Amp (100 µg/ml) y se dejó crecer a la temperatura óptima (20-37°C) hasta que la DO<sub>550 nm</sub> alcanzó 0,6-0,8. La expresión de proteína recombinante se indujo mediante adición de IPTG (concentración final 0,2 mM) y el cultivo se incubó durante 3 horas adicionales. Las bacterias se recogieron mediante centrifugación a 8000 x g durante 15 minutos a 4°C.

El sedimento bacteriano se resuspendió en 7,5 ml de PBS frío. Las células se rompieron mediante sonicación en hielo durante 30 segundos a 40 W usando un sonicador Branson 450 y se centrifugaron a 13000 x g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se recogió y se mezcló con 150 µl de resina Glutation-Sefarosa 4B (Pharmacia), previamente equilibrada con PBS, y se incubó a temperatura ambiente con agitación suave durante 30 minutos. La preparación se centrifugó lote a lote a 700 x g durante 5 minutos a 4°C y el sobrenadante se descartó. La resina se lavó dos veces (lote a lote) con 10 ml de PBS frío durante 10 minutos, se resuspendió en 1 ml de PBS frío, y se cargó sobre una columna desechable. La resina continuó lavándose con PBS frío, hasta que la DO<sub>280nm</sub> del flujo a su través alcanzó 0,02-0,01. La proteína de condensación GST se eluyó mediante adición de 700 µl de tampón de elución de glutatión (glutatión reducido 10 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8,0) y se recogieron las fracciones, hasta que la DO<sub>280nm</sub> del eluato indicó que se obtuvo toda la proteína recombinante. Se analizaron alícuotas de 20 µl de cada fracción de elución mediante SDS-PAGE usando un gel al 12%. La masa molecular de las proteínas purificadas se determinó usando bien el estándar de peso molecular de amplio intervalo de Bio-Rad (M1) (200, 116, 97,4, 66,2, 45,0, 31,0, 21,5, 14,4, 6,5 kDa) o bien el Amersham Rainbow Marker (M2) (220, 66,2, 46,0, 30,0, 21,5, 14,3 kDa). Los pesos moleculares de las proteínas de condensación GST son una combinación de la proteína GST de 26 kDa y su compañero de fusión. Las concentraciones de proteína se estimaron usando el ensayo de Bradford.

#### **Purificación a gran escala de proteínas solubles de condensación His**

Para algunos ORF, se cultivó una única colonia durante toda una noche a 37°C en una placa de agar LB + Amp. Las bacterias se inocularon en 20 ml de cultivo líquido LB + Amp y se incubaron durante toda una noche en un agitador de baño de agua. Las bacterias se diluyeron a 1:30 en 600 ml de medio recién preparado y se dejaron crecer a la temperatura óptima (20-37°C) a una DO<sub>550</sub> de 0,6-0,8. La expresión de las proteínas se indujo mediante la adición de IPTG 1 mM y el cultivo se incubó adicionalmente durante tres horas. El cultivo se centrifugó a 8000 rpm a 4°C, el sobrenadante se descartó y el sedimento bacteriano se resuspendió en 7,5 ml de tampón de imidazol 10 mM frío (NaCl 300 mM, tampón fosfato 50 mM, imidazol 10 mM, pH 8). Las células se rompieron mediante sonicación en hielo durante 30 segundos a 40 W usando un sonicador Branson B-15, se congelaron y se descongelaron dos veces y se centrifugaron de nuevo. El sobrenadante se recogió y se mezcló con 150 µl de resina Ni<sup>2+</sup> (Pharmacia) (previamente lavada con tampón de imidazol 10 mM) y se incubaron a temperatura ambiente con agitación suave durante 30 minutos. La muestra se centrifugó a 700 g durante 5 minutos a 4°C. La resina se lavó dos veces con 10 ml de tampón de imidazol 10 mM frío durante 10 minutos, se resuspendió en 1 ml de tampón de imidazol 10 mM frío y se cargó en una columna desechable. La resina se lavó a 4°C con 2 ml de tampón de imidazol 10 mM frío hasta que el flujo a su través alcanzó una DO<sub>280</sub> de 0,02-0,06. La resina se lavó con 2 ml de tampón de imidazol 20 mM frío (NaCl 300 mM, tampón fosfato 50 mM, imidazol 20 mM, pH 8) hasta que el flujo a su través alcanzó la DO<sub>280</sub> de 0,02-0,06. La proteína de condensación His se eluyó mediante la adición de 700 µl de tampón de imidazol 250 mM frío (NaCl 300 mM, tampón fosfato 50 mM, imidazol 250 mM, pH 8) y se recogieron las fracciones hasta que la DO<sub>280</sub> fue de 0,1. Se introdujeron 21 µl de cada fracción en un gel SDS al 12%.

#### **Purificación a gran escala de proteínas insolubles de condensación His**

Una única colonia se cultivó durante toda una noche a 37°C en una placa de agar LB + Amp. Las bacterias

se inocularon en 20 ml de cultivo líquido LB + Amp en un agitador de baño de agua y se cultivaron durante toda una noche. Las bacterias se diluyeron a 1:30 en 600 ml de medio recién preparado y se dejaron crecer a la temperatura óptima (37°C) a una DO<sub>550</sub> de 0,6-0,8.

La expresión de las proteínas se indujo mediante la adición de IPTG 1 mM y el cultivo se incubó adicionalmente durante tres horas. El cultivo se centrifugó a 8000 rpm a 4°C. El sobrenadante se descartó y el sedimento bacteriano se resuspendió en 7,5 ml de tampón de B (urea 8 M, Tris-HCl 10 mM, tampón fosfato 10 mM, pH 8,8). Las células se rompieron mediante sonicación en hielo durante 30 segundos a 40 W usando un sonicador Branson B-15, se congelaron y se descongelaron dos veces y se centrifugaron de nuevo. El sobrenadante se almacenó a -20°C, mientras que los sedimentos se resuspendieron en 2 ml de tampón de guanidina (clorhidrato de guanidina 6 M, tampón fosfato 100 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5) y se trataron en un homogeneizador durante 10 ciclos. El producto se centrifugó a 13.000 rpm durante 40 minutos. El sobrenadante se mezcló con 150 µl de resina Ni<sup>2+</sup> (Pharmacia) (previamente lavada con tampón B) y se incubó a temperatura ambiente con agitación suave durante 30 minutos. La muestra se centrifugó a 700 g durante 5 minutos a 4°C. La resina se lavó dos veces con 10 ml de tampón B durante 10 minutos, se resuspendió en 1 ml de tampón B y se cargó en una columna desechable. La resina se lavó a temperatura ambiente con 2 ml de tampón B hasta que el flujo a su través alcanzaba una DO<sub>280</sub> de 0,02-0,06. La resina se lavó con 2 ml de tampón C (urea 8 M, Tris-HCl 10 mM, tampón fosfato 100 mM, pH 6,3) hasta que el flujo a su través alcanzó la DO<sub>280</sub> de 0,02-0,06. La proteína de condensación His se eluyó mediante la adición de 700 µl de tampón de elución (urea 8 M, Tris-HCl 10 mM, tampón fosfato 100 mM, pH 4,5) y las fracciones se recogieron hasta que la DO<sub>280</sub> fue de 0,1. Se introdujeron 21 µl de cada fracción en un gel SDS al 12%.

### Purificación proteínas insolubles de condensación His

Para cada clon a purificarse como una condensación His, se extendió en forma de línea una colonia individual y se cultivó durante toda una noche a 37°C en una placa de agar de LB/Amp (100 µg/ml). Se inoculó una colonia aislada a partir de esta placa en 20 ml de medio líquido LB/Amp (100 µg/ml) y se dejó crecer a la temperatura óptima (20-37°C) hasta que la hasta que la DO<sub>550nm</sub> alcanzó 0,6-0,8. La expresión de la proteína recombinante se indujo mediante adición de IPTG (concentración final 1,0 mM) y el cultivo se incubó durante unas 3 horas adicionales. Las bacterias se recogieron mediante centrifugación a 8000 x g durante 15 minutos a 4°C.

El sedimento bacteriano se resuspendió en 7,5 ml de bien de (i) tampón frío AS (NaCl 30 mM, tampón fosfato 50 mM, imidazol 10 mM, pH 8,0) para proteínas solubles o (ii) tampón B (urea 8M, Tris-HCl 10 mM, tampón fosfato 100 mM, pH 8,8) para proteínas insolubles. Las células se rompieron mediante sonicación en hielo cuatro veces durante 30 segundos a 40 W usando un sonicador de Branson 450 y centrifugado a 13000 x g durante 30 minutos a 4°C. Para proteínas insolubles, los sedimentos se resuspendieron en 2,0 ml de tampón C (clorhidrato de guanidina 6M, tampón fosfato 100 mM, Tris-HCl 19 mM, pH 7,5) y se trataron con un homogeneizador de Dounce durante 10 ciclos. El homogenizado se centrifugó a 13000 x g durante 40 minutos y el sobrenadante se retiene.

Los sobrenadantes tanto para preparaciones solubles como para preparaciones insolubles se mezclaron con 150 µl de resina Ni<sup>2+</sup> (previamente equilibrada bien con tampón A o bien con tampón B, según sea apropiado) y se incubó a temperatura ambiente agitación suave durante 30 minutos. La resina era Chelating Sepharose Fast Flow (Pharmacia), preparada de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. La preparación lote a lote se centrifugó a 700 x g durante 5 minutos a 4°C y el sobrenadante se descartó. La resina se lavó dos veces (lote a lote) con 10 ml de tampón A o B durante 10 minutos, se resuspendió en 1,0 ml de tampón A o B y se cargó sobre una columna desechable. La resina continuó lavándose con éter (i) tampón A a 4°C o (ii) tampón B a temperatura ambiente, hasta que la DO<sub>280nm</sub> del flujo a su través alcanzó 0,02-0,01. La resina se lavó adicionalmente bien con (i) tampón frío C (NaCl 300 mM, tampón fosfato 50 mM, imidazol 20 mM, pH 8,0) o (ii) tampón D (urea 8 M, Tris-HCl 10 mM, tampón fosfato 100 mM, pH 6,3) hasta que la DO<sub>280nm</sub> indicó que toda la proteína recombinante estaba obtenida. Se analizaron alícuotas de 20 µl de cada fracción de elución mediante SDS-PAGE usando un gel al 12%. Las concentraciones de las proteínas se estimaron usando el ensayo de Bradford.

### Renaturalización de proteínas de condensación His

En los casos donde se requirió desnaturalización para solubilizar proteínas, se empleó una etapa de renaturalización antes de la inmunización. Se añadió glicerol a las fracciones desnaturalizadas obtenidas anteriormente dando una concentración final del 10% (v/v). Se diluyeron las proteínas a 200 µg/ml usando tampón de diálisis I (glicerol al 10% (v/v), arginina 0,5 M, tampón fosfato 50 mM, glutatión reducido 5 mM, glutatión oxidado 0,5 mM, urea 2 M, pH 8,8) y se dializaron frente al mismo tampón durante 12-14 horas a 4°C. Se llevó a cabo diálisis adicional con tampón II (glicerol al 10% (v/v), arginina 0,5 M, tampón fosfato 50 mM, glutatión reducido 5,0 mM, glutatión oxidado 0,5 mM, pH 8,8) durante 12-14 horas a 4°C.

Alternativamente, se añadió glicerol al 10% a las proteínas desnaturalizadas. Las proteínas se diluyeron a 20 µg/ml usando tampón de diálisis I (glicerol al 10% (v/v), arginina 0,5 M, tampón fosfato 50 mM, glutatión reducido 5 mM, glutatión oxidado 0,5 mM, urea 2 M, pH 8,8) y se dializaron frente al mismo tampón durante 12-14 horas a 4°C.



La concentración de proteína se evaluó usando la fórmula:

$$\text{Proteína (mg/ml)} = (1,55 \times \text{DO}_{280}) - (0,76 \times \text{DO}_{280})$$

## 5 Purificación de proteínas

Para analizar la solubilidad, se resuspendieron los sedimentos obtenidos de cultivos 3,0 ml en 500  $\mu$ l de tampón M1 (PBS pH 7,2). Se añadieron 25  $\mu$ l de lisozima (10 mg/ml) y la bacteria se incubó durante 15 minutos a 4°C. Las células se rompieron mediante sonicación en hielo cuatro veces durante 30 segundos a 400 W usando un sonicador de Branson 450 y centrifugando a 13000 x g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se recogió y el sedimento se resuspendió en tampón M2 [urea 8 M, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M] y se incubaron durante 3 a 4 horas a 4°C. Después de centrifugación, el sobrenadante se recogió y el sedimento se resuspendió en tampón M3 [guanidinio-HCl 6M, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M] durante toda una noche a 4°C. Los sobrenadantes de todas las etapas se analizaron mediante SDS-PAGE. Algunas proteínas se encontró que eran solubles en PBS, otras necesitan urea o guanidinio-HCl para solubilización.

Para purificaciones a escala preparativa, se indujeron 500 cultivos y se solubilizaron proteínas de fusión en cada tampón M1, M2 o M3 usando el procedimiento descrito anteriormente. Los extractos en bruto se cargaron sobre una columna de superflujos de Ni-NTA (Quiagen) equilibrada con tampón M1, M2 o M3 dependiendo de la solubilización de tampón empleada. Se eluyó el material no unido lavando la columna con el mismo tampón. La proteína de fusión recombinante se eluyó con el tampón correspondiente que contenía imidazol 500 mM dializado después frente al mismo tampón en la ausencia de imidazol.

## 25 Inmunizaciones de ratones

Se usaron 20  $\mu$ g de cada proteína purificada inmunizando ratones por vía intraperitoneal. En el caso de algunos ORF, se inmunizaron ratones Balb-C con Al(OH)<sub>3</sub> como coadyuvante en los días 1, 21 y 42, y la respuesta inmune se controló en muestras tomadas el día 56. Para otros ORF, los ratones CD1 podían inmunizarse usando el mismo protocolo. Alternativamente, 20  $\mu$ g de cada proteína purificada se mezclaron con coadyuvante de Freund y se usaron para inmunizar ratones CD1 intraperitonealmente. Para muchas de las proteínas, la inmunización se llevó a cabo en días 1, 21 y 35, y la respuesta inmune se controló en mezclas tomadas en los días 34 y 49. Para algunas proteínas, la tercera inmunización se llevó a cabo en el día 28, más que el 35, y la respuesta inmune se midió en los días 20 y 42, más que 34 y 49.

## 35 Ensayo ELISA (análisis de los sueros)

La cepa M7 de MenB no encapsulado se colocó en placas de agar chocolate y se incubó durante toda una noche a 37°C. Se recogieron colonias bacterianas a partir de las placas de agar usando un hisopo de dracón estéril y se inocularon en 7 ml de Caldo Mueller-Hinton (Difco) que contenía glucosa al 0,25%. El crecimiento bacteriano se controló cada 30 minutos siguiendo la DO<sub>620</sub>. Se dejó crecer a las bacterias hasta que la DO alcanzaba el valor de 0,3-0,4. El cultivo se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 rpm. El sobrenadante se descartó y las bacterias se lavaron una vez con PBS, se resuspendieron en PBS que contenía formaldehído al 0,025% y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y después durante toda una noche a 4°C con agitación. Se añadieron 100  $\mu$ l de células bacterianas a cada pocillo de una placa Greiner de 96 pocillos y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Después se lavaron los pocillos tres veces con tampón de lavado PBT (Tween 20 al 0,1% en PBS). Se añadieron 200  $\mu$ l de tampón de saturación (polivinilpirrolidona a 2,7% en agua) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 2 horas a 37°C. Se lavaron los pocillos tres veces con PBT. Se añadieron 200  $\mu$ l de suero diluido (tampón de dilución: BSA al 1%, Tween 20 al 0,1%, NaN<sub>3</sub> al 0,1% en PBS) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 90 minutos a 37°C. Los pocillos se lavaron tres veces con PBT. Se añadieron 100  $\mu$ l de suero anti-ratón de conejo conjugado con HRP (Dako) diluido a 1:2000 en tampón de dilución a cada pocillo y las placas se incubaron durante 90 minutos a 37°C. Los pocillos se lavaron tres veces con tampón PBT. Se añadieron 100  $\mu$ l de tampón sustrato para HRP (25 ml de tampón citrato pH 5, 10 mg de O-fenildiamina y 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O) a cada pocillo y las placas se dejaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadieron 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a cada pocillo y se siguió la DO<sub>490</sub>. El ensayo ELISA se consideró positivo cuando la DO<sub>490</sub> era 2,5 veces la de los sueros pre-inmunes respectivos.

Alternativamente, la cepa M7 de MenB no encapsulado se plaqueó en placas de agar chocolate y se incubó durante toda una noche a 37°C. Las colonias bacterianas se recogieron a partir de las placas de agar usando un hisopo de dracón estéril y se inocularon en Caldo Mueller-Hinton (Difco) que contiene 0,25% de glucosa. El crecimiento bacteriano se controló cada 30 minutos siguiendo DO<sub>620</sub>. Las bacterias se dejaron crecer hasta que la DO alcanzaba el valor de 0,3-0,4. El cultivo se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 rpm. El sobrenadante se descartó y las bacterias se lavaron una vez con PBS, se resuspendieron en PBS que contenía formaldehído al 0,025%, y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y después durante toda una noche a 4°C con agitación. Se añadieron 100  $\mu$ l de células bacterianas a cada pocillo de una placa Greiner de 96 pocillos y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Después se lavaron los pocillos tres veces con tampón de lavado PBT

(Tween 20 al 0,1% en PBS). Se añadieron 200  $\mu$ l de tampón de saturación (polivinilpirrolidona a 2,7% en agua) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 2 horas a 37°C. Se lavaron los pocillos tres veces con PBT. Se añadieron 200  $\mu$ l de suero diluido (tampón de dilución: BSA al 1%, Tween 20 al 0,1%,  $\text{NaN}_3$  al 0,1% en PBS) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 90 minutos a 37°C. Los pocillos se lavaron tres veces con PBT. Se añadieron 100  $\mu$ l de suero anti-ratón de conejo conjugado con HRP (Dako) diluido a 1:2000 en tampón de dilución a cada pocillo y las placas se incubaron durante 90 minutos a 37°C. Los pocillos se lavaron tres veces con tampón PBT. Se añadieron 100  $\mu$ l de tampón sustrato para HRP (25 ml de tampón citrato pH 5, 10 mg de O-fenildiamina y 10  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a cada pocillo y las placas se dejaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadieron 100  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a cada pocillo y se siguió la  $\text{DO}_{490}$ . Las valoraciones de ELISA se calcularon arbitrariamente según la dilución de suero que dio un valor de  $\text{DO}_{490}$  de 0,4 anteriormente al nivel de sueros preinmunitarios. El ELISA se consideró positivo cuando la dilución de sueros con  $\text{DO}_{490}$  de 0,4 fue mayor de 1:400.

#### Procedimiento de ensayo de Unión de Bacterias FACScan

La cepa M7 de MenB encapsulados plaqueó en placas de agar chocolate y se incubó durante toda una noche a 37°C. Se recogieron colonias bacterianas a partir de las placas de agar usando un hisopo de dracon estéril y se inocularon en 4 tubos que contenían 8 ml cada uno de Caldo Mueller-Hinton (Difco) que contenía glucosa a 0,25%. El crecimiento bacteriano se controló cada 30 minutos siguiendo la  $\text{DO}_{620}$ . Se dejó crecer a las bacterias hasta que la DO alcanzó el valor de 0,35-0,5. El cultivo se centrifugó durante 10 minutos a 4.000 rpm. El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en tampón de bloqueo (BSA a 1%,  $\text{NaN}_3$  a 0,4%) y se centrifugó durante 5 minutos a 4.000 rpm. Las células se resuspendieron en tampón de bloqueo para alcanzar  $\text{DO}_{620}$  de 0,07. Se añadieron 100  $\mu$ l de células bacterianas a cada pocillo de una placa Costar de 96 pocillos. Se añadieron 100  $\mu$ l de sueros diluidos (1:100, 1:200, 1:400) (en tampón de bloqueo) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 2 horas a 4°C. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 4.000 rpm, se aspiró el sobrenadante y las células se lavaron mediante la adición de 200  $\mu$ l/pocillo de tampón de bloqueo en cada pocillo. Se añadieron 100  $\mu$ l de  $\text{F(ab)}_2$  conjugado con R-ficoeritrina de cabra anti-ratón, diluido a 1:100, a cada pocillo y las placas se incubaron durante una hora a 4°C. Las células se sedimentaron mediante centrifugado a 4.000 rpm durante 5 minutos y se lavaron mediante adición de 200  $\mu$ l/pocillo de tampón de bloqueo. El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron en 200  $\mu$ l/pocillo de PBS, formaldehído al 0,25%. Las muestras se transfirieron a tubos FACScan y se leyeron. Las condiciones para el ajuste del FACScan (15 mW de Potencia Láser) eran: FL2 activado, umbral de FSC-H: 92; voltaje de FSC PMT: E 01; SSC PMT: 474; aumentos de amplitud 6,1; FL-2 PMT: 586; valores de compensación: 0.

#### Preparaciones de OMV

Se cultivaron bacterias durante toda una noche en 5 placas GC, se recogieron con un asa y se resuspendieron en 10 ml de Tris-HCl 20 mM. Se realizó inactivación con calor a 56°C durante 30 minutos y las bacterias se rompieron mediante sonicación durante 10 minutos en hielo (50% de ciclo de trabajo, 50% de rendimiento). Las células sin romper se eliminaron mediante centrifugación a 5000 g durante 10 minutos y la fracción de la envuelta celular total se recuperó mediante centrifugación a 50.000 g a 4°C durante 75 minutos. Para extraer las proteínas de la membrana citoplasmática de las membranas externas en bruto, toda la fracción se resuspendió en sarkosyl al 2% (Sigma) y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. La suspensión se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos para eliminar los agregados, y el sobrenadante se ultracentrifugó a 50.000 g durante 75 minutos sedimentando las membranas externas. Las membranas externas se resuspendieron en Tris-HCl 10 mM, pH 8 y la concentración de proteínas se midió mediante el ensayo Bio-Rad Protein, usando BSA como un estándar.

#### Preparación de Extractos Totales

Se cultivaron las bacterias durante toda la noche en una placa GC, se recogieron con un asa y se resuspendieron en 1 ml de Tris-HCl 20 mM. Se realizó inactivación con calor a 56°C durante 30 minutos.

#### Inmunotransferencia de Western

Se cargaron proteínas purificadas (500 ng/pista), vesículas de membrana externa (5  $\mu$ g) y de extractos de células totales (25  $\mu$ g) derivados de la cepa de MenB 2996 en gel de SDS-poliacrilamida al 12% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se realizó durante 2 horas a 150 mA a 4°C, usando tampón de transferencia (base de Tris al 0,3%, glicina al 1,44% y metanol al 20%). La membrana se saturaba mediante incubación durante toda una noche a 4°C en tampón de saturación (leche desnatada al 10%, Tritón X100 a 0,1% en PBS). La membrana se lavó dos veces con tampón de lavado (leche desnatada al 3%, Tritón X100 al 0,1% en PBS) y se incubó durante 2 horas a 37°C en sueros de ratón diluidos en tampón de lavado 1:200. La membrana se lavó dos veces y se incubó durante 90 minutos en una dilución 1:2000 de Ig anti-ratón marcada con peroxidasa de rábano rusticano. La membrana se lavó dos veces con Tritón X100 a 0,1% en PBS y se desarrolló con el kit Opti-4CN Substrate (Bio-Rad). La reacción se interrumpió añadiendo agua.

#### Ensayo bactericida

Las cepas MC58 y 2996 se cultivaron durante toda una noche a 37°C en placas de agar chocolate. Se recogieron 5-7 colonias y se usaron inoculando 7 ml de caldo Mueller-Hinton. La suspensión se incubó a 37°C en un mezclador nutator y se dejó crecer hasta que la DO<sub>620</sub> estaba entre 0,5-0,8. El cultivo se dividió en alícuotas en tubos Eppendorf estériles de 1,5 ml y se centrifugó durante 20 minutos a velocidad máxima en una microcentrífuga. El sedimento se lavó una vez en tampón de Gey (Gibco) y se resuspendió en el mismo tampón a una DO<sub>620</sub> de 0,5, se diluyó a 1:20000 en tampón de Gey y se almacenó a 25°C.

Se añadieron 50 µl de tampón Gey/BSA al 1% a cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos. Se añadieron 25 µl de sueros de ratón diluidos (1:100) (tampón de dilución: tampón de Gey/BSA al 0,2%) a cada pocillo y la placa se incubó a 4°C. Se añadieron 25 µl de la suspensión bacteriana descrita anteriormente a cada pocillo. Se añadieron 25 µl de complemento de cría de conejo inactivado con calor (baño de agua de 56°C durante 30 minutos) o normal a cada pocillo. Inmediatamente después de la adición del complemento de cría de conejo, se colocaron 22 µl de cada muestra/pocillo en placas de agar Mueller-Hinton (tiempo 0). La placa de 96 pocillos se incubó durante 1 hora a 37°C con rotación y después se plaquearon 22 µl de cada muestra/pocillo en placas de agar Mueller-Hinton (tiempo 1). Después de una incubación durante toda la noche se contaron las colonias correspondientes a tiempo 0 y a tiempo 1.

EJEMPLO 1

Usando los procedimientos descritos anteriormente, se emplearon los siguientes cebadores de oligonucleótidos en el ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el fin de clonar el ORF 953:

**Tabla 1:** Oligonucleótidos usados para PCR para amplificar el ORF 953 completo o parcial

Reverse	CCC <u>GCTCGAG</u> -TTTAGAACCGCATTGGCC	XhoI
953 Forward	CGC <u>GATCCC</u> ATATG-GCCACCTACAAAGTGGAC	BamHI-NdeI

Se identificó la siguiente secuencia de ADN parcial en *N.gonorrhoeae* <SEQ ID 2915>:

```

g953 .seq
1 ATGAAAAAAAA TCATCTTCGC CGCGCTCGCA GCGGCAGCCG TCGGCACTGC
51 CTCCGCCACC TACAAAGTGG ACGAATATCA CGCCAACGTC CGTTTCGCCA
101 TCGACCACTT CAACACCAGC ACCAACGTCG GCGGTTTTTA CGTCTGACC
151 GGTTCGCTCG AGTTCGATCA AGCAAAACGC GACGGCAAAA TCGACATCAC
201 CATTCCCGTC GCCAACCTGC AAAGCGGTTC GCAACCCTTC ACGGGCCACC
251 TGAATCCGC CGACATCTTC GATGCCGCTC AATATCCGGA CATCCGCTTC
301 GTTCCACCA AATCAACTT CAACGGCAAA AAAGTGTTC CGTTGACGG
351 CAACCTGACC ATGCGCGGCA AAACCGCCCC CGTCAAACCT AAAGCCGAAA
401 AATCAACTG CTACCAAGC CCGATGGCGG AAACCGAAGT TTGCGGCGGC
451 GACTTCAGCA CCACCATCGA CCGCACAAA TGGGGCGTGG ACTACCTCGT
501 TAACGCCGGT ATGACCAAAA ACGTCCGCAT CGACATCAA ATCGAAGCTG
551 CAAAACAATA A
    
```

Esto corresponde a la secuencia de aminoácidos <SEQ ID 2916; ORF 953.ng>:

```

g953 .pep
1 MKKIIFAALA AAVGTASAT YKVDEYHANV RFAIDHFNST TNVGGFYGLT
51 GSVEFDQAKR DGKIDITIPV ANLQSGSQPF TGHLSADIF DAAQYDIRF
101 VSTKFNFNKG KLVSV DGNLT MRGKTAPVKL KA EKFNQYQS PMAETEVCVG
151 DFSTTIDRTK WGV DYL V NAG MTKNVRIDIQ IEAAKQ*
    
```

Se identificó la siguiente secuencia de ADN parcial en *N.meningitidis* <SEQ ID 2917>:

```

m953 .seq
1 ATGAAAAAAAA TCATCTTCGC CGCACTCGCA GCCGCCGCCA TCAGTACTGC
51 CTCCGCCGCC ACCTACAAAG TGGACGAATA TCACGCCAAC GCCCGTTTCG
101 CCATCGACCA TTCAACACC AGCACCAACG TCGGCGGTTT TTACGGTCTG
151 ACCGGTTCCG TCGAGTTCGA CCAAGCAAAA CGCGACGGTA AAATCGCAT
201 CACCATCCCC ATTGCCAACC TGCAAAGCGG TTCGCAACAC TTTACCGACC
251 ACCTGAAATC AGCCGACATC TTCGATGCCG CCAATATCC GGACATCCCG
301 TTTGTTTCCA CCAAATTCAA CTTCAACGGC AAAAACTGG TTTCCGTTGA
351 CGGCAACCTG ACCATGCACG GCAAAACCGC CCCCCTCAA CTCAAAGCCG
401 AAAAATTCOA CTGCTACCAA AGCCCGATGG AGAAAACCGA AGTTTGTTGG
451 GCGGACTTCA GCACCACCAT CGACCGCACC AAATGGGGCA TGGACTACCT
501 CGTTAACGTT GGTATGACCA AAAGCGTCCG CATCGACATC CAAATCGAGG
551 CAGCCAAACA ATAA
    
```

Esto corresponde a la secuencia de aminoácidos <SEQ ID 2918; ORF 953>:

```

5      m953 . pep
      1  MKKIIFAALA AAAISTASAA TYKVDEYHAN ARFAIDHFNT STNVGGFYGL
      51  TGSVEFDQAK RDGKIDITIP IANLQSGSQH FTDHLKSADI FDAAQYPPDIR
      101 FVSTKFNENG KKLVSVDGNL TMHGKTAPVK LKAEKFNCYQ SPMEKTEVCG
      151 GDFSTTIDRT KWGM DYLVNV GMTRKSVRIDI QIEAAKQ*
  
```

10 El análisis informático de esta secuencia de aminoácidos dio los siguientes resultados: Homología con un ORF predicho de *N.gonorrhoeae* ORF 953 muestra un 93.0% de identidad sobre un solapamiento de 187 aa con un ORF predicho (ORF 953) de *N. gonorrhoeae*.

```

15      m953/g953      93,0% de identidad en un solapamiento de 187 aa
      10      20      30      40      50      60
m953 . pep      MKKIIFAALAAAIASTASAAATYKVDEYHANARFAIDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAK
g953            MKKIIFAALAAAIVGTASA~TYKVDEYHANVRFAIDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAK
      10      20      30      40      50
      70      80      90      100     110     120
m953 . pep      RDGKIDITIPIANLQSGSQHFTDHLKSADIFDAAQYPPDIRFVSTKFNENGGKLVSDGNL
g953            RDGKIDITIPVANLQSGSQPFTGHLKSADIFDAAQYPPDIRFVSTKFNENGGKLVSDGNL
      60      70      80      90      100     110
      130     140     150     160     170     180
m953 . pep      TMHGKTAPVKLKAEFNCYQSPMEKTEVCGGDFSTTIDRTKWGM DYLVNVGMTRKSVRIDI
g953            TMRGKTAPVKLKAEFNCYQSPMAETEVCVCGGDFSTTIDRTKWGV DYLVNAGMTRKSVRIDI
      120     130     140     150     160     170
m953 . pep      QIEAAKQX
g953            QIEAAKQX
      180
  
```

35 Se identificó la siguiente secuencia de ADN parcial en *N.meningitidis* <SEQ ID 2919>:

```

40      a953 . seq
      1  ATGAAAAAAA TCATCATCGC CGCGCTCGCA GCAGCCGCCA TCGGCACTGC
      51  CTCGCGCGCC ACCTACAAAG TGGACGAATA TCACGCCAAC GCCCGTTTCT
      101 CTATCGACCA TTTCAACACC AGCACCAACG TCGGCGGTTT TTACGGTCTG
      151 ACCGGTTCCG TTGAGTTCGA CCAAGCAAAA CGCGACGGTA AAATCGACAT
      201 CACCATCCCC GTTGCCAACC TGCAAAGCGG TTCGCAACAC TTTACCGACC
      251 ACCTGAAATC AGCCGACATC TTCGATGCCG CCCAATATCC GGACATCCGC
      301 TTTGTTTCCA CCAAAATCAA CTTCAACGGC AAAAACTGG TTTCCGTTGA
      351 CGGCAACCTG ACCATGCACG GCAAAACCGC CCCCGTCAA CTCAAAGCCG
      401 AAAAATTCAA CTGCTACCAA AGCCCGATGT TGA AAACCGA AGTTTGCGGC
      451 GGCGACTTCA GCACCACCAT CGACCGCACC AAATGGGGCA TGGACTACCT
      501 CGTTAACGTT GGTATGACCA AAAGCGTCCG CATCGACATC CAAATCGAGG
      551 CAGCCAAACA ATAA
  
```

55 Esto corresponde a la secuencia de aminoácidos <SEQ ID 2920; ORF 953.a>:

```

60      a953 . pep
      1  MKKIIAALA AAAIGTASAA TYKVDEYHAN ARFSIDHFNT STNVGGFYGL
      51  TGSVEFDQAK RDGKIDITIP VANLQSGSQH FTDHLKSADI FDAAQYPPDIR
      101 FVSTKFNENG KKLVSVDGNL TMHGKTAPVK LKAEKFNCYQ SPMLKTEVCG
      151 GDFSTTIDRT KWGM DYLVNV GMTRKSVRIDI QIEAAKQ*
  
```

65 El análisis informático de esta secuencia de aminoácidos dio los siguientes resultados: Homología con un ORF predicho de *N. meningitidis* ORF 953 muestra un 97,3% de identidad sobre un solapamiento de 187 aa con un ORF predicho (ORF 953) de *N. meningitidis*.

5

**a953/m953** 97,3% de identidad en un solapamiento de 187 aa

10

```

a953.pep 10 20 30 40 50 60
MKKIIIAALAAAAIGTASAATYKVDEYHANARFSDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAK
|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||
m953 10 20 30 40 50 60
MKKIIFAALAAAAISTASAATYKVDEYHANARFAIDHFNTSTNVGGFYGLTGSVEFDQAK

```

15

```

a953.pep 70 80 90 100 110 120
RDGKIDITIPVANLQSGSQHFTHLKSADIFDAAQYPDIRFVSTKFNFGKKLVSDGNL
|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||
m953 70 80 90 100 110 120
RDGKIDITIPIANLQSGSQHFTHLKSADIFDAAQYPDIRFVSTKFNFGKKLVSDGNL

```

20

```

a953.pep 130 140 150 160 170 180
TMHGKTAPVKLKAERFNCYQSPMLKTEVCGGDFSTTIDRTKWGMDYLVNVGMTKSVRIDI
|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||
m953 130 140 150 160 170 180
TMHGKTAPVKLKAERFNCYQSPMEKTEVCGGDFSTTIDRTKWGMDYLVNVGMTKSVRIDI

```

25

```

a953.pep QIEAAKQX
|||||||
m953 QIEAAKQX

```

30

Los ejemplos precedentes pretenden ilustrar pero no limitar la invención.

35

40

45

50

55

60

65

**Reivindicaciones**

- 5      **1.** Una composición que comprende una proteína aislada que comprende: (i) una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente de las SEQ IDs 2918, 2916 y 2920; o (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene un 90% o más de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente de las SEQ IDs 2918, 2916 y 2920.
- 2.** La composición de la reivindicación 1, que incluye un adyuvante.
- 10     **3.** La composición de la reivindicación 2, en la que el adyuvante son sales de aluminio o MF59.
- 4.** Un anticuerpo que se une específicamente con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente de las SEQ IDs 2918, 2916 y 2920.
- 15     **5.** Una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína como se define en la reivindicación 1.
- 6.** Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo consistente de las SEQ IDs 2917, 2915 y 2919.
- 20     **7.** Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6.
- 8.** Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.
- 25     **9.** El vector de la reivindicación 8, que es un vector de expresión.
- 10.** Una célula huésped transformada con el vector de la reivindicación 8 o al reivindicación 9.
- 30     **11.** Un proceso para producir una proteína como se define en la reivindicación 1, que comprende el paso de cultivar una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 10 bajo condiciones que inducen la expresión de la proteína.
- 12.** El uso de una proteína como se define en la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de infección debida a bacterias de Neisseria.

35

40

45

50

55

60

65