

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 951**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)
C07K 14/22 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
A61K 39/095 (2006.01)
A61K 39/40 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2000 E 10179001 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 2275554**

54 Título: **Péptidos antigénicos de Neisseria**

30 Prioridad:

29.10.1999 US 162616 P

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

07.07.2015

73 Titular/es:

**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L.
(100.0%)
Via Fiorentina 1
53100 Siena , IT**

72 Inventor/es:

**GALEOTTI, CESIRA;
GRANDI, GUIDO;
MASIGNANI, VEGA;
MORA, MARIROSA;
PIZZA, MARIAGRAZIA;
RAPPUOLI, RINO;
RATTI, GIULIO;
SCARLATO, VINCENZO y
SCARSELLI, MARIA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 539 951 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos antigénicos de Neisseria.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a secuencias de péptidos antigénicos de las bacterias *Neisseria meningitidis*.

TÉCNICA ANTERIOR

10

N. meningitidis es un diplococo Gram-negativo no móvil que es patógeno en seres humanos.

15

Basándose en polisacárido capsular del organismo, se han identificado 12 serogrupos de *N. meningitidis*. El grupo A es el patógeno más frecuentemente implicado en la enfermedad epidémica en el África subsahariana. Los serogrupos B y C son responsables de la gran mayoría de casos en los Estados Unidos y en la mayoría de los países desarrollados. Los serogrupos W 135 e Y son responsables del resto de los casos en los Estados Unidos y países desarrollados.

20

25

30

La vacuna meningocócica actualmente en uso es una vacuna de polisacárido tetravalente compuesta de los serogrupos A, C Y y W135. Sin embargo, el meningococo B sigue siendo un problema. El enfoque de polisacáridos no puede usarse debido a que el polisacárido capsular menB es un polímero del ácido *N*-acetilneuramínico enlazado a $\alpha(2-8)$ que también está presente en el tejido de mamífero. Un enfoque a una vacuna de menB usa mezclas de proteínas de la membrana externa (OMP). 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]. Proteínas adicionales que van a usarse en las 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)]. Las proteínas 1 y 2 de unión a transferrina meningocócicas están ambas expuestas en la superficie y generan anticuerpos bactericidas capaces de aniquilar cepas homólogas y heterólogas. [Vaccine 14(1):49-53].

35

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

40

45

La invención se refiere a fragmentos de la proteína 936-1 desvelada en las solicitudes de patente internacional WO99/57280 y WO00/22430 (las "solicitudes internacionales"), en las que los fragmentos comprenden al menos un determinante antigénico y están seleccionadas de los 5 fragmentos de la reivindicación 1, y la invención también proporciona proteínas que comprenden uno o más de estos 5 fragmentos.

50

55

La invención está sometida a la condición de que no incluye dentro de su alcance proteínas limitadas a cualquiera de las secuencias de proteína de longitud completa desveladas en las solicitudes internacionales (es decir, las SEC ID N° 2-3020 pares de WO99/57280 y las SEC ID N° 963-1045 impares de WO00/22430).

60

65

Las proteínas de la invención pueden prepararse, por supuesto, por diversos medios (por ejemplo, expresión recombinante, purificación a partir de cultivo celular, síntesis química, etc.) y en diversas formas (por ejemplo, fusiones nativas, del extremo C y/o extremo N, etc.). Se preparan preferentemente en forma sustancialmente pura (es decir, sustancialmente libre de otras proteínas de Neisseria o de células huésped). Se producen preferentemente proteínas cortas usando síntesis química de péptidos.

70

75

Según otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos que reconocen los fragmentos de la invención, con la condición de que la invención no incluya dentro de su alcance anticuerpos que reconocen cualquiera de las secuencias de proteínas completas en las solicitudes internacionales. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, y pueden producirse por cualquier medio adecuado.

80

85

Composiciones que comprenden proteína y/o anticuerpo según la invención pueden ser adecuadas como vacunas, por ejemplo, o como reactivos de diagnóstico, o como composiciones inmunogénicas.

90

95

La proteína, o anticuerpo según la invención, puede usarse como medicamentos (por ejemplo, como vacunas o como composiciones inmunogénicas) o como reactivos de diagnóstico. Pueden usarse en la fabricación de: (i) un medicamento para tratar o prevenir infección debida a la bacteria de Neisseria; (ii) un reactivo de diagnóstico para detectar la presencia de bacterias de Neisseria o de anticuerpos producidos contra bacterias de Neisseria; y/o (iii) un reactivo que puede producir anticuerpos contra bacterias de Neisseria. Dichas bacterias de Neisseria pueden ser de cualquier especie o cepa (tal como *N. gonorrhoeae*), pero son preferentemente *N. meningitidis*, especialmente la cepa A o la cepa B.

100

La divulgación también proporciona un método para tratar un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del ácido nucleico, proteína y/o anticuerpo según la invención.

Un resumen de las técnicas y procedimientos convencionales que pueden emplearse con el fin de realizar la invención (por ejemplo, utilizar las secuencias desveladas para vacunación o fines de diagnóstico) sigue a continuación. Este resumen no es una limitación de la invención, sino que más bien da ejemplos que pueden usarse, pero no se requieren.

5

General

La 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 conocimiento general de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, por ejemplo, Sambrook Molecular Cloning; A Laboratory Manual, segunda edición (1989); DNA Cloning, Volúmenes I and 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 los volúmenes 154 y 155; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.H. Miller and 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 las abreviaciones estándar para nucleótidos y aminoácidos.

10

15

20

Definiciones

25

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 el 90 % en peso del total de X+Y en la composición, más preferentemente al menos aproximadamente el 95 % o incluso el 99 % en peso.

30

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

El término “determinante antigénico” incluye epítopes de linfocitos B y epítopes de linfocitos T.

35

El término “heterólogo” 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 juntos, como cuando un promotor heterólogo a un gen está operativamente ligado al gen. Otro ejemplo es donde una secuencia de Neisseria es heteróloga a una célula huésped de ratón. Un ejemplo adicional sería dos epítopes de las mismas proteínas o proteínas diferentes que se han ensamblado en una proteína individual en una disposición no encontrada en la naturaleza.

40

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

45

Sistemas de expresión

Las secuencias de nucleótidos meningocócicas pueden expresarse en una variedad de diferentes sistemas de expresión; por ejemplo, aquellos usados con células de mamífero, baculovirus, plantas, bacterias y levadura.

50

i. Sistemas de mamífero

55

Se conocen en la técnica sistemas de expresión de mamífero. Un promotor de mamífero es cualquier secuencia de ADN capaz de unir la ARN polimerasa de mamífero e iniciar la transcripción en la dirección 3' (3') de una secuencia codificante (por ejemplo, gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de iniciación de la transcripción, que codificante se coloca próxima al extremo 5' de la secuencia codificante, y una caja TATA, normalmente localizada 25-30 pares de base (pb) en la dirección 5' del sitio de iniciación de la transcripción. Se cree que la caja TATA dirige la ARN polimerasa II para empezar la síntesis de AKN en el sitio correcto. Un promotor de mamífero también contendrá un elemento promotor en la dirección 5', normalmente localizado dentro de 100 a 200 pb en la dirección 5' de la caja TATA. Un elemento promotor en la dirección 5' determina la velocidad a la que se inicia la transcripción y puede actuar en cualquier orientación [Sambrook et al., (1989) “Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells” en Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª ed.].

60

65

Los genes virales de mamífero frecuentemente se expresan altamente y tienen un amplio intervalo de huéspedes; por lo tanto, las secuencias que codifican los genes virales de mamífero proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Ejemplos incluyen el promotor temprano del SV40, el promotor LTR del virus del tumor mamario de ratón, el promotor tardío principal del adenovirus (Ad MLP) y el promotor del virus del herpes simple. Además, las secuencias derivadas de genes no virales, tales como el gen de la metalotioneína murino, también proporcionan secuencias promotoras útiles. La expresión puede ser tanto constitutiva como regulada (inducible), dependiendo de que un promotor puede ser inducido con glucocorticoide en células sensibles a hormonas.

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 1000 veces cuando se liga a promotores homólogos o heterólogos, empezando la síntesis en el sitio de inicio de ARN normal. Los potenciadores también son activos cuando se colocan en la dirección 5' o en la dirección 3' desde el sitio de iniciación de la transcripción, en tanto la orientación normal como invertida, o a una distancia superior a 1000 nucleótidos desde el promotor [Maniatis et al., (1987) Science 236:1237; Alberts et al., (1989) Molecular Biology of the Cell, 2a. Ed.]. Los elementos potenciadores derivados de virus pueden ser particularmente útiles, debido a que normalmente tienen un intervalo más amplio de huéspedes. Ejemplos incluyen el potenciador del gen temprano del SV40 [Dijkema et al. (1985) EMBO J. 4:761] y el potenciador/promotores derivados de la repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma de Rous [Gorman et al. (1982b) Proc. Natl. Acad. Sci. 79:6777] y del citomegalovirus humano [Boshart et al. (1985) Cell 41:521]. Adicionalmente, algunos potenciadores son regulables y llegan a ser activos solo en presencia de un inductor, tal como una hormona o ión metálico [Sassone-Corsi y Borelli (1986) Trends Genet. 2:215; Maniatis et al. (1987) Science 236:1237].

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

Alternativamente, también pueden segregarse proteínas extrañas de la célula en los medios de crecimiento creando moléculas de ADN quiméricas que codifican una proteína de fusión comprendida en un fragmento de secuencia conductora que proporciona la secreción de la proteína extraña en células de mamífero. Preferentemente, existen sitios de procesamiento codificados entre el fragmento conductor y el gen extraño que se pueden escindirse tanto *in vivo* como *in vitro*. El fragmento de la secuencia conductora normalmente codifica un péptido señal que comprende aminoácidos hidrófobos que dirigen la secreción de la proteína desde la célula. El conductor tripartito de adenovirus es un ejemplo de una secuencia conductora que proporciona la secreción de una proteína extraña en células de mamífero.

Normalmente, las secuencias de terminación y poliadenilación de transcripción reconocidas por células de mamífero son regiones reguladoras localizadas 3' con respecto al codón de terminación de la traducción y, así, junto con los elementos promotores, flanquean la secuencia codificante. El extremo 3' del ARNm maduro se forma por escisión postranscripcional específica del sitio y poliadenilación [Birnstiel et al. (1985) Cell. 41:349; Proudfoot y Whitelaw (1988) "Termination and 3' end Processing of eukaryotic RNA. In Transcription and splicing (ed. B.D. Hames and 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. Ejemplos de señales del terminador de la transcripción/de poliadenilación incluyen aquellas derivadas del SV40 [Sambrook et al (1989) "Expression of cloned genes in cultured mammalian cells". En Molecular Cloning: A Laboratory Manual].

Normalmente, los componentes anteriormente descritos, que comprenden un promotor, señal de poliadenilación y secuencia de terminación de la transcripción, se ponen juntos en construcciones de expresión. También pueden incluirse potenciadores, intrones con sitios donadores y aceptores de corte y empalme funcionales y secuencias conductoras en una construcción de expresión, si se desea. Las construcciones de expresión frecuentemente se mantienen 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. Sistemas de replicación de mamífero incluyen aquellos derivados de virus de animales, que requieren factores de trans-activación para replicarse. Por ejemplo, los plásmidos que contienen los sistemas de replicación de los papovavirus, tales como SV40 [Gluzman (1981) Cell 23:175] o virus del poliovirus, se replican en un número de copias extremadamente alto en presencia del antígeno T viral apropiado. Ejemplos adicionales de replicones de mamífero incluyen aquellos derivados del virus papiloma bovino y virus de Epstein-Barr. Adicionalmente, el replicón puede tener dos sistemas de replicación, permitiendo así que se mantenga, por ejemplo, en células de mamífero para la expresión y en un huésped procarionta para la clonación y amplificación. Ejemplos de tales vectores lanzadera de mamífero-bacteria incluyen pMT2 [Kaufman et al (1989) Mol. Cell. Biol. 9:946] y pHEBO [Shimizu et al (1986) Mol. Cell. Biol. 6:1074].

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

núcleos.

Se conocen en la técnica líneas de células de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión e incluyen muchas líneas de células inmortalizadas disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), que incluyen, pero no se limitan a, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), y varias otras líneas celulares.

ii. Sistemas de baculovirus

El polinucleótido que codifica para la proteína también puede insertarse en un vector de expresión de insecto adecuado, y está operativamente ligado a los elementos de control dentro de ese 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, normalmente un plásmido bacteriano, que contiene tanto un fragmento del genoma de baculovirus como un sitio de restricción conveniente para la inserción del gen o genes heterólogos que van a expresarse; un baculovirus no mutante 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 de baculovirus); y células huésped de insecto apropiadas y medios de crecimiento.

Después de insertar de la secuencia de ADN que codifica la proteína en el vector de transferencia, el vector y el genoma viral no mutante se transfecan en una célula huésped de insecto en la que el vector y el genoma viral se dejan recombinar. El virus recombinante encapsidado se expresa y las placas recombinantes se identifican y purifican. Materiales y métodos para los sistemas de expresión de baculovirus/células de insecto están comercialmente disponibles en forma de kit a partir de, entre otros, Invitrogen, San Diego CA (kit "MaxBac"). Estas técnicas son generalmente conocidas por aquellos expertos en la técnica y se describen completamente en Summers y Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987) (posteriormente "Summers y Smith").

Antes de insertar la secuencia del ADN que codifica para la proteína en el genoma de baculovirus, los componentes anteriormente descritos, que comprenden un promotor, conductor (si se desea), una secuencia codificante de interés y la secuencia de terminación de la transcripción, normalmente se ensamblan en una construcción de translocación intermedia (vector de transferencia). Esta construcción puede contener un gen individual y elementos reguladores operativamente ligados; múltiples genes, cada uno con su conjunto propio de elementos reguladores operativamente ligados; o múltiples genes, regulados por el mismo conjunto de elementos reguladores. Las construcciones de translocación intermedias se mantienen frecuentemente en un replicón, tal como un elemento extracromosómico (por ejemplo, plásmidos) capaz del mantenimiento estable en un huésped, tal como una bacteria. El replicón tendrá un sistema de replicación, permitiendo así que se mantenga en un huésped adecuado para la clonación y amplificación.

Actualmente, el vector de transferencia más comúnmente usado para introducir genes extraños en AcNPV es pAc373. También se han diseñado muchos otros vectores, conocidos por aquellos expertos en la técnica. Éstos incluyen, por ejemplo, pVL985 (que altera el codón de iniciación de polihedrina de ATG a ATT, y que introduce un sitio de clonación BamHI 32 pares de base en la dirección 3' desde el ATT; ver Luckow y Summers, Virology (1989) 17:31.

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

Los vectores de transferencia de baculovirus contienen normalmente 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 en la dirección 3' (de 5' a 3') de una secuencia codificante (por ejemplo, gen estructural) en el ARNm. Un promotor tendrá una región de iniciación de la transcripción que normalmente se coloca próxima al extremo 5' de la secuencia codificante. Esta región de iniciación de la transcripción incluye normalmente un sitio de unión a ARN polimerasa y un sitio de iniciación de la transcripción. También un vector de transferencia de baculovirus puede tener un segundo dominio llamado un potenciador, que, si está presente, normalmente está distante del gen estructural. La expresión puede ser tanto regulada como constitutiva.

Los genes estructurales, abundantemente transcritos en los últimos tiempos en un ciclo de infección viral, proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Ejemplos incluyen secuencias derivadas del gen que codifica la proteína poliédrica viral. Friesen et al., (1986) "The Regulation of Baculovirus Gene Expression", en: The Molecular Biology of Baculoviruses (ed. Walter Doerfler); nº de publicación EPO 127.839 y 155.476; y el gen que codifica la proteína p10, Vlak et al., (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 polihedrina de baculovirus (Carbonell et al. (1988) Gene, 73:409).

Alternativamente, como las señales para las modificaciones postraduccionales de células de mamífero (tales como la escisión del péptido señal, la escisión proteolítica y fosforilación) parecen ser reconocidas por células de insecto y las señales requeridas para la secreción y acumulación nuclear también parecen estar conservadas entre las células de invertebrados y las células de vertebrados, también pueden usarse conductores de origen no de insecto, tales como aquellos derivados de genes que codifican para -interferón humano, Maeda et al., (1985), Nature 315:592; péptido que libera gastrina humana, Lebacqz-Verheyden et al., (1988), Molec. Cell. Biol. 8:3129; IL-2 humana, Smith et al., (1985) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 82:8404; IL-3 de ratón (Miyajima et al., (1987) Gene 58:273; y glucocerebrosidasa humana, Martin et al., (1988) DNA, 7:99, para proporcionar secreción en insectos.

Un polipéptido o poliproteína recombinante puede expresarse intracelularmente o, si se expresa con las secuencias reguladoras apropiadas, puede secretarse. La buena expresión intracelular de las proteínas extrañas no fusionadas normalmente requiere genes heterólogos que tengan idealmente una secuencia conductora corta que contenga señales de iniciación de la traducción adecuadas que precedan a una señal de iniciación de ATG. Si se desea, puede escindirise la metionina en el extremo N de la proteína madura por incubación *in vitro* con bromuro de cianógeno.

Alternativamente, las poliproteínas o proteínas recombinantes que normalmente no son secretadas pueden secretarse de la célula de insecto al crear moléculas de ADN quiméricas que codifican una proteína de fusión comprendida de un fragmento de secuencia conductora que proporciona la secreción de la proteína extraña en insectos. El fragmento de la secuencia conductora normalmente codifica un péptido señal que comprende aminoácidos hidrófobos que dirigen la translocación de la proteína en el retículo endoplásmico.

Después de la inserción de la secuencia de ADN y/o el gen que codifica el precursor del producto de expresión de la proteína, un huésped de célula de insecto se co-transforma con el ADN heterólogo del vector de transferencia y el ADN genómico del baculovirus no mutante, normalmente por co-transfección. La secuencia promotora y de terminación de la transcripción de la construcción normalmente comprenderá una sección de 2-5 kb del genoma de baculovirus. Se conocen en la técnica métodos para introducir ADN heterólogo en el sitio deseado en el virus de baculovirus (véase Summers y Smith arriba; Ju et al., (1987); Smith et al., Mol. Cell. Biol. (1983) 3:2156; y Luckow y Summers (1989)). Por ejemplo, la inserción puede ser en un gen tal como el gen de polihedrina, por una recombinación de entrecruzamiento doble homóloga; la inserción también puede ser en un sitio de enzima de restricción manipulado en el gen de baculovirus deseado. Miller et al, (1989), Bioessays 4:91. La secuencia de ADN, cuando se clona en lugar del gen de polihedrina en el vector de expresión, se flanquea tanto en 5' como en 3' por las secuencias específicas de polihedrina y se coloca en la dirección 3' del promotor de polihedrina.

El vector de expresión de baculovirus recientemente formado se encapsida posteriormente en un baculovirus recombinante infeccioso. La recombinante homóloga se produce a baja frecuencia (entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 5 %); así, la mayoría del virus producido después de la co-transfección es aún virus no mutante. Por lo tanto, es necesario un método para identificar virus recombinantes. Una ventaja del sistema de expresión es una selección visual que permite distinguir virus recombinantes. La proteína de polihedrina, que se produce por el virus nativo, se produce a niveles muy altos en los núcleos de células infectadas en momentos posteriores después de la infección viral. Una proteína de polihedrina acumulada forma cuerpos de oclusión que también contienen partículas incrustadas. Estos cuerpos de oclusión, de hasta 15 µm de tamaño, son altamente refractivos, dándoles una apariencia brillante radiante que se visualiza fácilmente bajo el microscopio óptico. Las células infectadas con virus recombinantes carecen de cuerpos de oclusión. Para distinguir el virus recombinante del virus no mutante, el sobrenadante de la transfección se siembra sobre una monocapa de células de insecto por técnicas conocidas por aquellos expertos en la técnica. Concretamente, las placas se seleccionan bajo el microscopio óptico para la presencia (indicativa del virus no mutante) o ausencia (indicativa de virus recombinante) de cuerpos de oclusión. "Current Protocols in Microbiology" Vol. 2 (Ausubel et al., eds.) at 16.8 (Supp. 10, 1990); Summers y Smith, arriba; Miller et al, (1989).

Se han desarrollado vectores de expresión de baculovirus recombinantes para la infección en 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* (documento WO 89/046699; Carbonell et al., (1985) J. Virol. 56:153; Wright Nature 321:718; Smith et al., (1983) Mol. Cell. Biol. 3:2156; y véase generalmente Fraser, et al., (1989) In Vitro Cell. Dev. Biol.. 25:225).

Las células y los medios de cultivo de células están comercialmente disponibles para tanto la expresión directa como de fusión de polipéptidos heterólogos en un baculovirus/sistema de expresión; la tecnología del cultivo celular se conoce generalmente por aquellos expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Summers y Smith, arriba.

Las células de insecto modificadas pueden entonces cultivarse en un medio nutriente apropiado, que permite el mantenimiento estable del (de los) plásmido(s) presente(s) en el huésped de insecto modificado. Si el gen del producto de expresión está bajo control inducible, el huésped puede cultivarse a alta densidad, e inducirse la expresión. Alternativamente, si la expresión es constitutiva, el producto se expresará continuamente en el medio y el medio nutritivo debe hacerse circular continuamente, mientras que se elimina el producto de interés y se aumentan los nutrientes agotados. El producto puede purificarse por técnicas tales como cromatografía, por ejemplo, HPLC,

5 cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, etc., electroforesis; centrifugación en gradiente de densidad; extracción con solvente o similares. Según convenga, el producto puede purificarse adicionalmente, según se requiera, de manera que se elimine sustancialmente cualquier proteína de insecto que también sea secretada en el medio o resulte de la lisis de células de insecto, de manera que se proporcione un producto que está al menos sustancialmente libre de residuos del huésped, por ejemplo, proteínas, lípidos y polisacáridos.

10 Con el fin de obtener la expresión de proteínas, las células huésped recombinantes derivadas de los transformantes se incuban bajo condiciones que permiten la expresión de la secuencia codificante de proteína recombinante. Estas condiciones variarán, dependiendo de la célula huésped seleccionada. Sin embargo, las condiciones son fácilmente verificables por aquellos expertos habituales en la materia, basándose en lo que se conoce en la técnica.

iii. Sistemas de Planta

15 Existen muchos sistemas de expresión genéticos de cultivo de células de planta y de plantas completas conocidos en la técnica. Sistemas de expresión genéticos celulares de planta a modo de ejemplo incluyen aquellos descritos en patentes tales como: documentos 5.693.506; US 5.659.122; y US 5.608.143. Ejemplos adicionales de expresión genética en el cultivo de células de plantas se han escrito por Zenk *Phytochemistry* 30:3861-3863 (1991). Descripciones de los péptidos señal de proteína de planta pueden encontrarse, además de las referencias descritas anteriormente, en Vaulcombe et al., *Mol. Gen. Genet.* 209:33-40 (1987); Chandler et al., *Plant Molecular Biology* 3:407-418 (1984); Rogers, *J. Biol. Chem.* 260:3731-3738 (1985); Rothstein et al., *Gene* 55:353-356 (1987); Whittier et al., *Nucleic Acids Research* 15:2515-2535 (1987); Wirsal et al., *Molecular Microbiology* 3:3-14 (1989); Yu et al., *Gene* 122:247-253 (1992). Una descripción de la regulación de la expresión del gen de planta por las enzimas de fitohormona, ácido giberélico y secretadas inducidas por ácido giberélico puede encontrarse en R.L. Jones and J. MacMillin, *Gibberellins: en: Advanced Plant Physiology*, Malcolm B. Wilkins, ed. , 1984 Pitman Publishing Limited, London, pp. 21-52. Referencias que describen otros genes metabólicamente regulados. Sheen, *Plant Cell*, 2:1027-1038(1990); Maas et al., *EMBO J.* 9:3447-3452 (1990); Benkel y Hickey, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:1337-1339 (1987).

30 Normalmente, usando técnicas conocidas en la técnica, se inserta una secuencia de polinucleótidos deseada en un casete de expresión que comprende elementos reguladores genéticos diseñados para la operación en plantas. El casete de expresión se inserta en un vector de expresión deseado con secuencias acompañantes en la dirección 5' y en la dirección 3' desde el casete de expresión adecuado para la expresión en un huésped de planta. Las secuencias acompañantes serán de plásmido o de origen viral y proporcionarán características necesarias al vector para permitir que los vectores muevan el ADN desde un huésped de clonación original, tal como bacterias, al huésped de planta deseado. La construcción básica de vector bacteriano/de planta proporcionará preferentemente un amplio intervalo de huéspedes de origen de replicación procarionta; un marcador de selección procarionta; y para transformaciones con *Agrobacterium*, secuencias de ADN T para la transferencia mediada por *Agrobacterium* a cromosomas de planta. Si el gen heterólogo no es fácilmente susceptible a la detección, la construcción también tendrá preferentemente un gen marcador de selección adecuado para determinar si se ha transformado una célula de planta. Una revisión general de marcadores adecuados, por ejemplo, para los miembros de la familia de los céspedes, se encuentra en Wilmink y Dons, 1993, *Plant Mol. Biol.* Repr, 11(2):165-185

45 También se recomiendan secuencias adecuadas para permitir la integración de la secuencia heteróloga en el genoma de planta. Éstas pueden incluir secuencias de transposón y similares para la recombinación homologa, así como secuencias Ti que permiten la inserción aleatoria de un casete de expresión heterólogo en un genoma de planta. Marcadores de selección procarionta adecuados incluyen resistencia hacia 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.

50 Las moléculas de ácido nucleico de la invención objeto pueden incluirse en un casete de expresión para la expresión de la(s) proteína(s) de interés. Normalmente, sólo habrá un casete de expresión, aunque son factibles dos o más. El casete de expresión recombinante contendrá, además de la secuencia codificante de la proteína heteróloga, los siguientes elementos, una región promotora, secuencias no traducidas en 5' de planta, codón de iniciación dependiendo de si el gen estructural venga equipado con uno o no, y una secuencia de terminación de la transcripción y traducción. Los sitios de enzima de restricción únicos en los extremos 5' y 3' del casete permiten la fácil inserción en un vector preexistente.

60 Una secuencia codificante heteróloga puede ser cualquier proteína que se refiera a la presente invención. La secuencia que codifica la proteína de interés codificará un péptido señal que permite el procesamiento y translocación de la proteína, según convenga, y normalmente carecerá de cualquier secuencia que pudiera producir la unión de la proteína deseada de la invención a una membrana. Como, en general, la región de iniciación de la transcripción será para un gen que se exprese y transcoloque durante la germinación, al emplear el péptido señal que proporciona la translocación, también puede proporcionarse la translocación de la proteína de interés. De esta manera, la(s) proteína(s) de interés se translocará(n) de las células en las que se expresarán y pueden recogerse eficazmente. Normalmente, la secreción en semillas es a través de la capa del epitelio de aleurona o escutelar, en el endosperma de la semilla. Aunque no se requiere que la proteína secrete de las células en las cuales se produce la proteína, esto facilita el aislamiento y la purificación de la proteína recombinante.

Como la expresión final del producto génico deseado será en una célula eucariota, se desea determinar si cualquier porción del gen clonado contiene secuencias que se procesarán como intrones por la maquinaria del espliceosoma del huésped. Si es así, puede realizarse la mutagénesis dirigida al sitio de la región de "intrón" para impedir la pérdida de una porción del mensaje genético como un código de intrón falso, Redd 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 en la célula de planta usando polietilenglicol, Krens, et al., Nature, 296, 72-74, 1982. Otro método de introducción de los segmentos de ácido nucleico es la penetración balística de alta velocidad por pequeñas partículas con el ácido nucleico tanto dentro de la matriz de perlas pequeñas o partículas como en la superficie, Klein, et al., Nature 327,70-73, 1987, y Knudsen y Muller, 1991, Planta 185:330-336 que enseña el bombardeo de partículas del endospermo de cebada para crear cebada transgénica. Aun otro método de introducción sería la fusión de protoplastos con otras entidades, ya sea minicélulas, células, lisosomas u otros cuerpos de superficie de lípido fusibles, Fraley, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1859-1863, 1982.

El vector también puede introducirse en las células vegetales por electroporación (Fromm et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 82:5824, 1985). En esta técnica, los protoplastos de planta se someten a electroforesis en presencia de plásmidos que contienen la construcción génica. Los impulsos eléctricos de una fuerza de alto campo permeabilizan reversiblemente las biomembranas, permitiendo la introducción de los plásmidos. Los protoplastos de planta sometidos a electroforesis reforman la pared celular, se dividen y forman el callo de la planta.

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

Los medios para la regeneración varían de especie a especie de plantas, pero generalmente se proporciona primero una suspensión de protoplastos transformados que contienen copias del gen heterólogo. Se forma tejido del callo y pueden inducirse brotes del callo y posteriormente arraigan. Alternativamente, puede inducirse la formación de embriones de la suspensión de protoplastos. Estos embriones germinan como embriones naturales para formar plantas. Los medios de cultivo contendrán generalmente diversos aminoácidos y hormonas, tales como auxina y citocinas. También es ventajoso añadir ácido glutámico y prolina al medio, especialmente para especies tales como maíz y alfalfa. Los brotes y raíces normalmente se desarrollarán simultáneamente. La eficaz regeneración dependerá del medio, del genotipo y de la historia del cultivo. Si se controlan estas tres variables, entonces la regeneración es completamente reproducible y repetible.

En algunos sistemas de cultivo de células de planta, la proteína deseada de la invención puede secretarse o, alternativamente, la proteína puede extraerse de la planta completa. Si la proteína deseada de la invención es secretada en el medio, puede recogerse. Alternativamente, los embriones y las semillas sin embrión a la mitad u otro tejido de planta pueden romperse mecánicamente para liberar cualquier proteína secretada entre células y tejidos. La mezcla puede suspenderse en una disolución de tampón para recuperar las proteínas solubles. Entonces se usarán métodos convencionales de purificación y aislamiento de proteínas para purificar la proteína recombinante. Los parámetros de tiempo, temperatura, pH, oxígeno y volúmenes se ajustarán mediante métodos rutinarios para optimizar la expresión y recuperación de la proteína heteróloga.

iv. Sistemas bacterianos

Se conocen en la técnica técnicas de expresión bacterianas. Un promotor bacteriano es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa bacteriana e iniciar de la transcripción en la dirección 3' (3') de una secuencia codificante (por ejemplo, gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de iniciación de la transcripción que normalmente se coloca próxima al extremo 5' de la secuencia codificante. Esta región de iniciación de la transcripción normalmente incluye un sitio de unión a ARN polimerasa y un sitio de iniciación de la transcripción. Un promotor bacteriano también puede tener un segundo dominio llamado un operador, que puede solapar un sitio de unión de ARN polimerasa adyacente en el que empieza la síntesis de ARN. El operador permite la transcripción regulada negativa (inducible) ya que una proteína represora del gen puede unir el operador y así inhibir la transcripción de un gen específico. Puede producirse expresión constitutiva en ausencia de elementos reguladores negativos, tales como el operador. Además, puede lograrse regulación positiva por una secuencia de unión a proteína del activador de gen, que, si está presente, normalmente está próxima (5') a la secuencia de unión de ARN polimerasa. Un ejemplo de una proteína activadora de gen es la proteína activadora de catabolito (CAP), que ayuda a iniciar la transcripción del operón lac en *Escherichia coli* (*E. coli*) [Raibaud et al. (1984) Annu. Rev. Genet. 18:173].

Por lo tanto, la expresión regulada puede ser tanto positiva como negativa, por lo que tanto mejora como reduce la transcripción.

Las secuencias que codifican enzimas de la ruta metabólica proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Ejemplos incluyen secuencias promotoras derivadas de las enzimas de metabolización del azúcar, tales como galactosa, lactosa (*lac*) [Chang et al., (1977) *Nature* 198:1056] y maltosa. Ejemplos adicionales incluyen secuencias promotoras derivadas de enzimas biosintéticas tales como triptófano (*trp*) [Goeddel et al. (1980) *Nuc. Acids Res.* 8:4057; Yelverton et al. (1981) *Nucl. Acids Res.* 9:731; patente de los Estados Unidos nº 4.738.921; EP-A-0036776- y EP-A-0121775]. El sistema promotor de g-laotamasa (*bla*) [Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes" en *Interferon 3* (ed. 1. Gresser)], los sistemas promotores de bacteriófago lambda PL [Shimatake et al. (1981) *Nature* 292:128] y T5 [patente de EE.UU. nº 4.689.406] también proporcionan secuencias promotoras útiles.

Además, los promotores sintéticos que no se producen en la naturaleza también funcionan como promotores bacterianos. Por ejemplo, pueden unirse las secuencias de activación de la transcripción de un promotor bacteriano o de bacteriófago con las secuencias de operón de otro promotor bacteriano o de bacteriófago, creando un promotor híbrido sintético [patente de EE.UU. nº 4.551.433]. Por ejemplo, el promotor *tac* es un promotor *tpr-lac* híbrido que comprende tanto las secuencias del promotor *trp* como del operón *lac* que se regulado por el represor *lac* [Amann et al. (1983) *Gene* 25:167; de Boer et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:21]. Además, un promotor bacteriano puede incluir promotores que se producen naturalmente de origen no bacteriano que tienen la capacidad de unirse a la ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción. Un promotor que se produce naturalmente de origen no bacteriano también puede acoplarse con una ARN polimerasa compatible para producir altos niveles de expresión de algunos genes en procariontes. El sistema de ARN polimerasa T7/promotor de bacteriófago es un ejemplo de un sistema promotor acoplado [Studier et al. (1986) *J. Mol. Biol.* 189:113; Tabor et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:1074]. Además, un promotor híbrido también puede comprender un promotor de bacteriófago y una región del operador de *E. coli* (documento EPO-A-0 267 851).

Además de una secuencia promotora del funcionamiento, un sitio de unión a ribosoma eficaz también es útil para la expresión de genes extraños en procariontes. En *E. coli*, el sitio de unión a ribosoma se llama la secuencia de Shine-Dalgarno (SD) e incluye un codón de iniciación (ATG) y una secuencia de 3-9 nucleótidos de longitud localizada 3-11 nucleótidos en la dirección 5' del codón de iniciación [Shine et al. (1975) *Nature* 254:34]. Se cree que la secuencia SD promueve la unión de ARNm al ribosoma por el apareamiento de bases entre la secuencia de SD y 3' de ARNr 16S de *E. coli* [Steitz et al. (1979) "Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA" en *Biological Regulation and Development: Gene Expression* (ed. R.F. Goldberg)]. Para expresar genes eucariotas y genes procariontes con sitio de unión a ribosoma débil [Sambrook et al. (1989) "Expression of cloned genes in *Escherichia coli*" en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*].

Una molécula de ADN puede expresarse intracelularmente. Se puede enlazar directamente una secuencia promotora con la molécula de ADN, en cuyo caso el primer aminoácido del extremo N siempre será 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 por la incubación *in vitro* con bromuro de cianógeno o por tanto la incubación *in vitro* como *in vivo* con una peptidasa del extremo N de metionina bacteriana (documento EPO-A-0 219.237).

Las proteínas de fusión proporcionan una alternativa a la expresión directa. Normalmente, una secuencia de ADN que codifica la porción del extremo N de una proteína bacteriana endógena, u otra proteína estable, se fusiona con el extremo 5' de las secuencias codificantes heterólogas. Tras la expresión, esta construcción proporcionará una fusión de las dos secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, el gen de células lambda de bacteriófago puede enlazarse en el extremo 5' de un gen extraño y expresarse en bacterias. La proteína de fusión resultante retiene preferentemente un sitio para una enzima de procesamiento (factor Xa) para escindir la proteína del bacteriófago del gen extraño [Nagai et al. (1984) *Nature* 309:810]. También pueden prepararse proteínas de fusión con secuencias de los genes *lacZ* [Jia et al. (1987) *Gene* 60:197], *trpE* [Allen et al. (1987) *J. Biotechnol.* 5:93; Makoff et al. (1989) *J. Gen. Microbiol.* 135:11] y *Chey* [documento EP-A-0 324 647]. La secuencia de ADN en la unión de las dos secuencias de aminoácidos puede o puede no codificar un sitio escindible. Otro ejemplo es una proteína de fusión de ubiquitina. Una proteína de fusión tal se hace con la región de ubiquitina que retiene preferentemente un sitio para una enzima de procesamiento (por ejemplo, proteasa de procesamiento específica de ubiquitina) para escindir la ubiquitina de la proteína extraña. Mediante este método, puede aislarse proteína extraña nativa [Miller et al. (1989) *Bio/Technology* 7:698]. Alternativamente, también pueden secretarse proteínas extrañas de la célula creando moléculas de ADN químicas que codifican una proteína de fusión que comprende un fragmento de la secuencia de péptido señal que proporciona la secreción de la proteína extraña en bacterias [patente de EE.UU. 4.336.336]. El fragmento de la secuencia de señal normalmente codifica un péptido señal que comprende aminoácidos hidrófobos que dirigen la secreción de la proteína desde la célula. La proteína es tanto secretada en los medios de crecimiento (bacterias Gram-positivas) como en el espacio periplásmico, localizado entre la membrana interna y externa de la célula (bacterias Gram-negativas). Preferentemente, existen sitios de procesamiento, que pueden escindirse tanto *in vivo* como *in vitro*, codificados entre el fragmento de péptido señal y el gen extraño.

El ADN que codifica las secuencias señal adecuadas puede derivarse de genes para proteínas bacterianas secretadas, tal como el gen de proteína de la membrana externa de *E. coli* (*ompA*) [Masui et al. (1983), en:

Experimental Manipulation of Gene Expression; Ghrayeb et al. (1984) EMBO J. 3:2437] y la secuencia señal de fosfatasa alcalina de *E. coli* (*phoA*) [Oka et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82:7212]. Como 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 et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582; documento EP- A-0 244 042].

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

Normalmente, los componentes anteriormente descritos, que comprenden un promotor, secuencia señal (si se desea), secuencia codificante de interés y secuencia de terminación de la transcripción, se ponen conjuntamente en construcciones de expresión. Las construcciones de expresión frecuentemente se mantienen en un replicón, tal como un elemento extracromosómico (por ejemplo, plásmidos) capaces del mantenimiento estable en un huésped, tal como bacterias. El replicón tendrá un sistema de replicación, permitiéndole así que se mantenga en un huésped procarionta tanto para la expresión como para la clonación y amplificación. Además, un replicón puede ser tanto un plásmido con un número de copias alto o bajo. Un plásmido con un número de copias alto tendrá generalmente un número de copias que oscila de aproximadamente 5 a aproximadamente 200, y normalmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 150. Un huésped que contiene un plásmido en número de copias alto contendrá preferentemente al menos aproximadamente 10, y más preferentemente al menos aproximadamente 20 plásmidos. Puede seleccionarse tanto un vector con un número de copia alto como bajo, dependiendo del efecto del vector y la proteína extraña en el huésped.

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

Normalmente, las construcciones de expresión extracromosómicas y de integración pueden contener marcadores de selección para permitir la selección de cepas bacterianas que han sido transformadas. Los marcadores de selección pueden expresarse en el huésped bacteriano y pueden incluir genes que convierten a la bacteria en resistente a fármacos tal como ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, kanamicina (neomicina) y tetraciclina [Davies et al. (1978) Annu. Rev. Microbiol. 32:469]. Los marcadores de selección también pueden incluir genes biosintéticos, tales como aquellos en las rutas biosintéticas de histidina, triptófano y leucina.

Alternativamente, algunos de los componentes anteriormente descritos pueden ponerse junto con vectores de transformación. Los vectores de transformación están normalmente comprendidos de un marcador de selección que se mantiene tanto en un replicón como se desarrolla en un vector de integración, como se ha descrito anteriormente.

Se han desarrollado vectores de expresión y transformación, tanto replicones extracromosómicos como vectores de integración, para la transformación en muchas bacterias. Por ejemplo, se han desarrollado vectores de expresión para, entre otras, las siguientes bacterias: [Palva et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582; documentos EP-A-0 036 259 y EP-A-0 063 953; WO 84/04541], *Escherichia coli* [Shimatake et al. (1981) Nature 292:128; Amann et al. (1985) Gene 40:183; Studier et al. (1986) J. Mol. Biol. 189:113; documentos EP-A-0 036 776, EP-A-0 136 829 y EP-A-0 136 907], *Streptococcus cremoris* [Powell et al. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655]; *Streptococcus lividans* [Powell et al. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655], *Streptomyces lividans* [patente de EE.UU. 4.745.056]. Los métodos para introducir ADN exógeno en huéspedes bacterianos son muy conocidos en la técnica, y normalmente incluyen tanto la transformación de bacterias tratadas con CaCl₂ como otros agentes, tales como cationes divalentes y DMSO. El ADN también puede introducirse en linfocitos bacterianos por electroporación. Los procedimientos de transformación normalmente varían con las especies bacterianas que van a transformarse. Véase, por ejemplo, [Masson et al. (1989) FEMS Microbiol. Lett. 60:273; Palva et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582; documentos EP-A-0 036 259 y EP-A-0 063 953; WO 84/04541, *Bacillus*], [Miller et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:856; Wang et al. (1990) J. Bacteriol. 172:949, *Campylobacter*], [Cohen et al. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. 69:2110; Dower et al. (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 and S. Nicosia); Mandel et al. (1970) J. Mol. Biol. 53:159; Taketo (1988) Biochim. Biophys. Acta 949:318; *Escherichia*], [Chassy et al. (1987) FEMS Microbiol. Lett. 44:173 *Lactobacillus*]; [Fiedler et al. (1988) Anal. Biochem 170:38, *Pseudomonas*]; [Augustin et al. (1990) FEMS Microbiol. Lett. 66:203, *Staphylococcus*], [Barany et al. (1980) J. Bacteriol. 144:698; Harlander (1987) "Transformation of *Streptococcus lactis* by electroporation, en: Streptococcal Genetics (ed. J. Ferretti and R. Curtiss III); Perry et al. (1981) Infect. Immun. 32:1295; Powell et al. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655; Somkuti et al.

(1987) Proc. 4th Evr. Cong. Biotechnology 1:412, *Streptococcus*].

v. Expresión de levadura

5 Un experto en la técnica también conoce sistemas de expresión de levadura. Un promotor de levadura es cualquier secuencia de ADN capaz de unir la ARN polimerasa de levadura e iniciar la transcripción en la dirección 3' (3') de una secuencia codificante (por ejemplo, gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de iniciación de la transcripción que se coloca normalmente próxima al extremo 5' de la secuencia codificante. Esta región de iniciación de la transcripción incluye normalmente un sitio de unión a ARN polimerasa (la "caja TATA") y un sitio de iniciación de la transcripción. Un promotor de levadura puede tener también un segundo dominio llamado una secuencia activadora en la dirección 5' (UAS) que, si está presente, normalmente está distante 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 tanto positiva como negativa, tanto mejorando como reduciendo así la transcripción.

15 La levadura es un organismo de fermentación con una ruta metabólica activa, por lo tanto, las secuencias que codifican enzimas en la ruta metabólica proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Ejemplos incluyen alcohol deshidrogenasa (ADH) (documento EP-A-0 284 044), enolasa, glucocinasa, glucosa-6-fosfato-isomerasa, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAP o GAPDH), hexocinasa, fosfofructocinasa, 3-fosfoglicerato-mutasa y piruvato-cinasa (PyK) (documento EPO-A-O 329 203). El gen *PHO5* de levadura, que codifica la fosfatasa ácida, también proporciona secuencias promotoras útiles [Myanohara et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1].

25 Además, los promotores sintéticos que no se producen en la naturaleza también funcionan como promotores de levadura. Por ejemplo, las secuencias de 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. Ejemplos de tales promotores híbridos incluyen la secuencia reguladora de ADH enlazada a la región de activación de transcripción de GAP (patentes de EE.UU. nº 4.876.197 y 4.880.734). Otros ejemplos de promotores híbridos incluyen promotores que consisten en secuencias reguladoras de tanto los genes *ADH2*, *GAL4*, *GAL10* o *PHO5*, combinados con la región de activación transcripcional de un gen de enzima glucolítica tal como GAP o PyK (documento EP-A-0 164 556).
30 Además, un promotor de levadura puede incluir promotores que se producen naturalmente de un origen no de levadura que tienen la capacidad de unirse a la ARN polimerasa de levadura e iniciar la transcripción. Ejemplos de tales promotores incluyen, entre otros [Cohen et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:1078; Henikoff et al. (1981) Nature 283:835; Oldenburg et al. (1981) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 96:119; Hollenberg et al. (1979) "The Expression of Bacterial Antibiotic Resistance Genes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*" en: Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance (eds. K.N. Timmis and A. Puhler); Mercerau Puigalon et al. (1980) Gene 11:163; Panthier et al. (1980) Curr. Genet. 2:109].

35 Puede expresarse intracelularmente en levadura una molécula de ADN. Una secuencia promotora puede enlazarse directamente con la molécula de ADN, en cuyo caso el primer aminoácido en el extremo N de la proteína recombinante siempre será 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 por incubación *in vitro* con bromuro de cianógeno.

45 Las proteínas de fusión proporcionan una alternativa para los sistemas de expresión de levadura, así como en sistemas de expresión de mamífero, de baculovirus y bacterianos. Normalmente, una secuencia de ADN que codifica la porción extremo N de una proteína de levadura endógena, u otra proteína estable, se fusiona con el extremo 5' de secuencias codificantes heterólogas. Tras la expresión, esta construcción proporcionará una fusión de las dos secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, el gen de superóxido-dismutasa (SOD) de levadura o humano puede enlazarse 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 no un sitio escindible. Véase, por ejemplo, el documento EP-A-0 196 056. Otro ejemplo es una proteína de fusión de ubiquina. Una proteína de fusión tal se prepara con la región de ubiquina que retiene preferentemente un sitio para una enzima de procesamiento (por ejemplo, proteasa de procesamiento específica de ubiquitina) para escindir la ubiquitina de la proteína extraña. Mediante este método, por lo tanto, puede aislarse la proteína extraña nativa (por ejemplo, el documento WO 88/024066).

55 Alternativamente, también puede secretarse proteínas extrañas de la célula en los medios de crecimiento creando moléculas de ADN quiméricas que codifican una proteína de fusión que comprende un fragmento de secuencia conductora que proporciona la secreción de levadura de la proteína extraña. Preferentemente, existen sitios de procesamiento codificados entre el fragmento conductor y el gen extraño que puede escindirse tanto *in vivo* como *in vitro*. El fragmento de la secuencia conductora codifica normalmente un péptido señal que comprende aminoácidos hidrófobos que dirigen la secreción de la proteína desde la célula. El ADN que codifica secuencias señal adecuadas puede derivarse de genes para proteínas de levadura secretadas, tales como el gen de invertasa de levadura (documentos EP-A-0 012 873; JPO. 62.096.086) y el gen del factor A (patente de EE.UU. 4.588.684). Alternativamente, existen conductores de un origen no de levadura, tales como un conductor de interferón, que también proporcionan la secreción en la levadura (documento EP-A-0 060 057).

65 Una clase preferida de conductores de secreción son aquellos que emplean un fragmento del gen del alfa-factor de

levadura, que contiene tanto una secuencia señal de "pre" como una región "pro". Los tipos de fragmentos de alfa-factor que pueden emplearse incluyen el conductor del alfa-factor pre-pro de longitud completa (aproximadamente 83 residuos de aminoácidos), así como conductores de alfa-factor truncados (normalmente de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 residuos de aminoácidos) (patentes de EE.UU. nº 4.546.083 y 4.870.008; EP-A-0 324 274).

5 Conductores adicionales que emplean un fragmento conductor de alfa-factor que proporciona la secreción incluyen conductores de alfa-factor híbridos preparados con una pre-secuencia de una primera levadura, pero una pro-región de un segundo alfa-factor de levadura (véase, por ejemplo, el documento WO 89/02463).

10 Normalmente, las secuencias de terminación de la transcripción reconocidas por la levadura son regiones reguladoras localizadas 3' con respecto al codón de terminación de la traducción, y así junto con un promotor flanquean la secuencia codificante. Estas secuencias dirigen la transcripción de un ARNm que puede traducirse en el polipéptido codificado por el ADN. Ejemplos de la secuencia terminadora de la transcripción y otras secuencias de terminación reconocidas por levadura, tales como aquellas que codifican las enzimas glucolíticas.

15 Normalmente, los componentes anteriormente descritos, que comprenden un promotor, conductor (si se desea), secuencia codificante de interés y la secuencia de terminación de la transcripción, se ponen juntos en construcciones de expresión. Las construcciones de expresión frecuentemente se mantienen en un replicón, tal como un elemento extracromosómico (por ejemplo, plásmidos) capaz del mantenimiento estable en un huésped, tal como levadura o bacterias. El replicón puede tener dos sistemas de replicación, permitiéndole de esta manera ser mantenido, por ejemplo, en la levadura para la expresión y en un huésped procariota para la clonación y amplificación. Ejemplos de tales vectores lanzadera de bacteria-levadura incluyen Yep24 [Botstein et al. (1979) Gene 8:17-24], pCI/1 [Brake et al. (1984) PNAS USA 81:4642-4646] y YRp17 [Stinchcomb et al. (1982) J. Mol. Biol. 158:157]. Además, un replicón puede ser tanto un plásmido con un número de copias alto como bajo. Un plásmido con un número de copias alto tendrá generalmente un número de copias que oscila de aproximadamente 5 a aproximadamente 200, y normalmente aproximadamente 10 a aproximadamente 150. Un huésped que contiene un plásmido con un número de copias alto tendrá preferentemente al menos aproximadamente 10, y más preferentemente al menos aproximadamente 20. Puede seleccionarse la entrada de un vector con un número de copias alto o bajo, dependiendo del efecto del vector y la proteína extraña en el huésped. Véase, por ejemplo, Brake et al., arriba.

30 Alternativamente, las construcciones de expresión pueden integrarse en el genoma de levadura con un vector de integración. Los vectores de integración normalmente contienen al menos una secuencia homologa a un cromosoma de levadura que permite que el vector se integre, y preferentemente contienen dos secuencias homologas que flanquean la construcción de expresión. Las integraciones parecen resultar de recombinaciones entre el ADN homólogo en el vector y el cromosoma de levadura [Orr-Weaver et al. (1983) Methods in Enzymol. 101:228-245]. Un vector de integración puede dirigirse a un locus específico en la levadura al seleccionar la secuencia homologa apropiada para la inclusión en el vector. Véase Orr-Weaver et al., arriba. Una o más construcciones de expresión pueden integrarse, posiblemente afectando los niveles de la proteína recombinante producida [Rine et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:6750]. Las secuencias cromosómicas incluidas en el vector pueden producirse tanto como un segmento individual en el vector, que produce la integración del vector completo, como dos segmentos homólogos a segmentos adyacentes en el cromosoma y que flanquean la construcción de expresión en el vector, que puede producir la integración estable de únicamente la construcción de expresión. Normalmente, las construcciones de expresión extracromosómicas y de integración pueden contener marcadores de selección para permitir la selección de cepas de levadura que se han transformado. Los marcadores de selección pueden incluir genes biosintéticos que pueden expresarse en el huésped de levadura, tales como *ADE2*, *HIS4*, *LEU2*, *TRP1* y *ALG7*, y el gen de resistencia G418, que confiere resistencia en células de levadura a tunicamicina y G418, respectivamente. Además, un marcador de selección adecuado también puede proporcionar levadura con la capacidad para crecer en presencia de compuestos tóxicos, tales como metales. Por ejemplo, la presencia de *CUP1* permite que la levadura crezca en presencia de iones cobre [Butt et al. (1987) Microbiol. Rev. 51:351].

50 Alternativamente, algunos de los componentes anteriormente descritos pueden ponerse juntos en vectores de transformación. Los vectores de transformación normalmente comprenden un marcador de selección que tanto se mantiene en un replicón como se desarrolla en un vector de integración, como se ha descrito anteriormente.

55 Se han desarrollado vectores de expresión y transformación, tanto replicones extracromosómicos como vectores de integración, para la transformación de muchas levaduras. Por ejemplo, se han desarrollado vectores de expresión para, entre otras, las siguientes levaduras: *Candida albicans* [Kurtz, et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:142], *Candida maltosa* [Kunze, et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25:141], *Hansenula polymorpha* [Gleeson, et al. (1986) J. Gen. Microbiol. 132:3459; Roggenkamp et al. (1986) Mol. Gen. Genet. 202:302], *Kluyveromyces fragilis* [Das, et al. (1984) J. Bacteriol. 158:1165], *Kluyveromyces lactis* [De Louvencourt et al. (1983) J. Bacteriol. 154:737; Van den Berg et al. (1990) Bio/Technology 8:135], *Pichia guilliermondii* [Kunze et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25:141], *Pichia pastoris* [Cregg, et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:3376; patentes de EE.UU. nº 4.837.148 y 4.929.555], *Saccharomyces cerevisiae* [Hinnen et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929; Ito et al. (1983) J. Bacteriol. 153:163], *Schizosaccharomyces pombe* [Beach and Nurse (1981) Nature 300:706] y *Yarrowia lipolytica* [Davidow, et al. (1985) Curr. Genet. 10:380471 Gaillardin, et al. (1985) Curr. Genet. 10:49]. Métodos para introducir ADN exógeno en huéspedes de levadura son muy conocidos en la técnica, y normalmente incluyen tanto la transformación de esferoplasto como de células de levadura intactas tratadas con cationes alcalinos. Los procedimientos de

transformación normalmente varían con las especies de levadura que van a transformarse. Véase, por ejemplo [Kurtz et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:142; Kunze et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25:141; *Candida*]; [Gleeson et al. (1986) J. Gen. Microbiol. 132:3459; Roggenkamp et al. (1986) Mol. Gen. Genet. 202:302; *Hansenula*]; [Das et al. (1984) J. Bacteriol. 158:1165; De Louvencourt et al. (1983) J. Bacteriol. 154:1165; Van den Berg et al. (1990) Bio/Technology 8:135; *Kluyveromyces*]; [Cregg et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:3376; Kunze et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25:141; patente de EE.UU. nº 4.837.148 y 4.929.555; *Pichia*]; [Hinnen et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929; Ito et al. (1983) J. Bacteriol. 153:163; *Saccharomyces*]; [Beach and Nurse (1981) Nature 300:706; *Schizosaccharomyces*]; [Davidow et al. (1985) Curr. Genet. 10:39; Gaillardin et al. (1985) Curr Genet. 10:49; *Yarrowia*].

Anticuerpos

Como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” se refiere a un polipéptido o un grupo de polipéptidos compuestos de 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 distribución de carga complementaria a las características de un epítipo de un antígeno, que permite la unión del anticuerpo con el antígeno. “Anticuerpo” incluye, por ejemplo, anticuerpos vertebrados, anticuerpos híbridos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos alterados, anticuerpos univalentes, proteínas Fab y anticuerpos de dominio individual.

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

Los anticuerpos a las proteínas de la invención, tanto policlonales como monoclonales, pueden prepararse por métodos convencionales. En general, la proteína se usa primero para inmunizar un animal adecuado, preferentemente un ratón, rata, conejo o cabra. Se prefieren conejos y cabras para la preparación de sueros policlonales debido al volumen de suero que puede obtenerse y la disponibilidad de los anticuerpos anti-conejo y anti-cabra marcados. La inmunización se realiza generalmente mezclando o emulsionando la proteína en solución salina, preferentemente en un adyuvante tal como adyuvante completo de Freund, e inyectando la mezcla o emulsión parenteralmente (generalmente subcutáneamente o intramuscularmente). Normalmente es suficiente una dosis de 50-200 g/inyección. La inmunización se refuerza generalmente 2-6 semanas después con una o más inyecciones de la proteína en solución salina, preferentemente usando adyuvante incompleto de Freund. Alternativamente pueden generarse anticuerpos por inmunización *in vitro* usando métodos conocidos en la técnica, que para los fines de la presente invención se consideran equivalentes a la inmunización *in vivo*. Se obtienen antisueros policlonales sangrando el animal inmunizado en un recipiente de plástico o vidrio, incubando la sangre a 25 °C durante una hora, seguido de incubación a 4 °C durante 2-18 horas. El suero se recupera por centrifugación (por ejemplo, 1.000 g durante 10 minutos). Pueden obtenerse aproximadamente 20-50 ml por sangrado de los conejos.

Los anticuerpos monoclonales se preparan usando el método convencional de Kohler y Milstein [Nature (1975) 256:495-96], o una modificación del mismo. Normalmente, un ratón o rata se inmuniza como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, en vez de sangrar al animal para extraer el suero, se extrae el bazo (y opcionalmente varios ganglios linfáticos grandes) y se disocia en células individuales. Si se desea, las células del bazo pueden cribarse (después de eliminar las células no específicamente adherentes) aplicando una suspensión celular a una placa o pocillo recubierto con el antígeno de proteína. Los linfocitos B que expresan la inmunoglobulina específica unida a membrana para el antígeno se unen a la placa, y no se enjuagan con el resto de la suspensión. Los linfocitos B resultantes, o todas las células del bazo disociadas, se inducen entonces para fusionarse con las células del mieloma para formar hibridomas, y se cultivan en un medio selectivo (por ejemplo, hipoxantina, aminopterina, medio de timidina, “HAT”). Los hibridomas resultantes se siembran por 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). Entonces, los hibridomas que secretan mAb seleccionados se cultivan tanto *in vitro* (por ejemplo, en botellas de cultivo de tejido o reactores de fibra hueca) como *in vivo* (como ascitis en ratones).

Si se desea, los anticuerpos (tanto policlonales como monoclonales) pueden marcarse usando técnicas convencionales. Marcas adecuadas incluyen fluoróforos, cromóforos, átomos radiactivos (particularmente ³²P y ¹²⁵I), reactivos de alta densidad electrónica, enzimas y ligandos que tienen componentes de unión específica. Las enzimas normalmente se detectan por su actividad. Por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante se detecta normalmente por su capacidad para convertir 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en un pigmento azul, cuantificable con un espectrofotómetro. “Componente de unión específica” se refiere a una proteína capaz de unirse a una molécula del ligando con alta especificidad, como, por ejemplo, en el caso de un antígeno y un anticuerpo monoclonal específico para el mismo. Otros componentes de unión específica incluyen biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A, y las numerosas parejas de reactor-ligando conocidas en la técnica. Debe entenderse que la descripción anterior no pretende clasificar las diversas marcas en distintas clases, ya que la misma marca puede servir en varios modos diferentes. Por ejemplo, ¹²⁵I puede servir de marca radiactiva o de un reactivo denso en electrones. HRP puede servir de enzima o de antígeno para un mAb. Además, pueden combinarse diversas marcas para el efecto deseado. Por ejemplo, los mAb y avidina también requieren marcas en la

práctica de la presente invención; así, podría marcarse un mAb con biotina, y detectarse su presencia con avidina marcada con ¹²⁵I, o con un mAb anti-biotina marcado con HRP. Otras permutaciones y posibilidades serán rápidamente evidentes para aquellos expertos habituales en la materia, y se consideran como equivalentes dentro del alcance de la invención.

5

Composiciones farmacéuticas

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

10

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 prevenir una enfermedad o afección deseada, o para presentar un efecto terapéutico o preventivo detectable. El efecto se puede detectar, por ejemplo, por marcadores químicos o niveles de antígeno. Los efectos terapéuticos también incluyen reducción en los síntomas físicos, tales como disminución de la temperatura corporal. La cantidad eficaz precisa para un sujeto dependerá del tamaño y salud del sujeto, la naturaleza y grado de la afección, y los productos terapéuticos o combinación de productos terapéuticos seleccionados para la administración. Así, no es útil especificar una cantidad eficaz exacta por adelantado. Sin embargo, la cantidad eficaz para una situación dada puede determinarse por experimentación rutinaria y está dentro del juicio del profesional clínico.

15

20

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 administra.

Una composición farmacéutica también puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo para la administración de un agente terapéutico, tal como anticuerpos o a un polipéptido, genes y otros agentes terapéuticos. El término se refiere a cualquier vehículo farmacéutico que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición, y que puede administrarse sin excesiva toxicidad. Vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes, lentamente metabolizadas, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido y partículas inactivas de virus. Tales vehículos son muy conocidos para aquellos expertos habituales en la materia.

25

30

Pueden usarse sales farmacéuticamente aceptables en el presente documento, 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 completa de excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

35

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

40

45

Métodos de administración

Una vez formuladas, las composiciones pueden administrarse directamente al sujeto. Los sujetos que van a tratarse pueden ser animales; en particular, que van a tratarse sujetos humanos.

50

La administración directa de las composiciones se llevará a cabo generalmente mediante inyección, tanto subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente o intramuscularmente como administradas al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también pueden administrarse en una lesión. Otros modos de administración incluyen administración oral y pulmonar, supositorios y administraciones transdérmicas o transcutáneas (véase, por ejemplo, el documento WO 98/20734), agujas y pistolas génicas o hiposprays. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis individual o un programa de dosis múltiple.

55

Vacunas

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

60

Tales vacunas comprenden antígeno(s) inmunizante(s), inmunogén (inmunogenes), polipéptido(s), proteína(s) o ácido nucleico, normalmente en combinación con "vehículos farmacéuticamente aceptables", que incluyen cualquier vehículo que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la

65

composición. Vehículos adecuados son normalmente macromoléculas grandes lentamente metabolizadas tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido, agregados lipídicos (tales como gotitas o liposomas de aceite) y partículas inactivas de virus. Tales vehículos son muy conocidos para aquellos expertos habituales en la materia. Adicionalmente, estos vehículos pueden funcionar como agentes inmunoestimulantes (“adyuvantes”). Además, el antígeno o inmunógeno puede conjugarse con un toxoide bacteriano, tal como un toxoide de difteria, tétanos, cólera, *H. pylori*, etc., patógenos.

Adyuvantes 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 emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como muramil péptidos (véase más adelante) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como, por ejemplo, (a) MF59™ (documento WO 90/14837; Capítulo 10 in *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*, eds. Powell & Newman, Plenum Press 1995), que contiene 5 % de escualeno, 0,5 % de Tween 80 y 0,5 % de Span 85 (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE (véase más adelante), aunque no se requiere) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, que contiene 10 % de escualeno, 4 % de Tween 80, 5 % de polímero L121 de bloques de Pluronic y thr-MDP (véase más adelante) tanto microfluidizado en una emulsión submicrométrica como sometido a vórtice para generar una emulsión con un mayor tamaño de partícula, y (c) el sistema adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene 2 % de escualeno, 0,2 % de Tween 80 y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste de monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y el esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™); (3) pueden usarse adyuvantes de saponina, tales como Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA), o partículas generadas del mismo tal como ISCOM (complejos inmunoestimulantes); (4) adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA); (5) citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferones (por ejemplo, gamma-interferón), el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis de tumor (TNF), etc.; y (6) otras sustancias que actúan de agentes inmunoestimulantes para potenciar la eficacia de la composición. Se prefieren alumbre y MF59™.

Como se ha mencionado anteriormente, los muramil péptidos incluyen, pero no se limitan a, N-acetil-muramil-L-treoniil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'- dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxfosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc. Las composiciones inmunogénicas (por ejemplo, el antígeno inmunizante/inmunógeno/polipéptido/proteína/ácido nucleico, vehículo farmacéuticamente aceptable y adyuvante) contendrán normalmente diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etanol, etc. Adicionalmente, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias de tamponamiento del pH y similares pueden estar presentes en estos vehículos.

Normalmente, las composiciones inmunogénicas se preparan como inyectables, bien como disoluciones líquidas o como suspensiones; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para la disolución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsular en liposomas para un efecto potenciado del adyuvante, como se trata anteriormente bajo los vehículos farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de los polipéptidos antigénicos o inmunogénicos, así como cualquier otro de los componentes anteriormente mencionados, según se necesite. Por “cantidad” inmunológicamente eficaz” se indica que la administración de esa cantidad a un individuo, bien en una dosis individual o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y afección física del individuo que va a tratarse, el grupo taxonómico del individuo que va a tratarse (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseada, la formulación de la vacuna, evaluación del doctor que trata la situación médica, y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad se encuentre en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos rutinarios.

Las composiciones inmunogénicas se administran convencionalmente parenteralmente, por ejemplo, por inyección, tanto subcutáneamente, intramuscularmente como transdérmicamente/transcutáneamente (por ejemplo, documento WO 98/20734). Formulaciones adecuadas adicionales para otros modos de administración incluyen formulaciones orales y pulmonares, supositorios y aplicaciones transdérmicas. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis individual o un programa de dosis múltiple. La vacuna puede administrarse conjuntamente con otros agentes inmunorreguladores.

Como una alternativa a las vacunas basadas en proteína, puede emplearse vacunación con ADN [por ejemplo, Robinson & Torres (1997) *Seminars in Immunology* 9:271-283; Donnelly et al. (1997) *Annu Rev Immunol* 15:617-648; véase después en el presente documento].

Composiciones farmacéuticas de polipéptidos

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

5 A. Polipéptidos

Un ejemplo son polipéptidos que incluyen, sin limitación: asioloorosomucoide (ASOR); transferrina; asialoglicoproteínas; anticuerpos; fragmentos de anticuerpo; ferritina, interleucinas; interferones, factor estimulantes de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de citoblastos y eritropoyetina. También pueden usarse antígenos virales, tales como proteínas de la envuelta. Por tanto, proteínas de otros organismos invasivos, tales como el péptido de 17 aminoácidos de la proteína de circumsporozoito de *Plasmodium falciparum*, conocida como RII.

15 B. Hormonas, vitaminas, etc.

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

20 C. Polialquilenos, polisacáridos, etc.

Por tanto, puede incluirse polialquilenglicol con los polinucleótidos/polipéptidos deseados. En una realización preferida, el polialquilenglicol es polietilenglicol. Además, pueden incluirse mono-, di-, o poli-sacáridos. En una realización preferida de este aspecto, el polisacárido es dextrano o DEAE-dextrano. Por tanto, quitosano y poli(lactida-co-glicolida).

25 D. Lípidos y liposomas

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

La encapsulación en lípidos se realiza generalmente usando liposomas que son capaces de unirse establemente o atrapar y retener el ácido nucleico. La relación de polinucleótido condensado con respecto a la preparación lipídica 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 distribución de ácidos nucleicos véase Hug and Sleight (1991) *Biochim. Biophys. Acta.* 1097:1-17; Straubinger (1983) *Meth. Enzymol.* 101:512-527..

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

Los liposomas catiónicos están fácilmente disponibles. Por ejemplo, están disponibles los liposomas de N-[1-2,3-dioleiloxi]propil]-N,N,N-trietilamonio (DOTMA) bajo la marca registrada Lipofectin, de GIBCO BRL, Grand Island, NY. (véase también Felgner, arriba). Otros liposomas comercialmente disponibles incluyen transfectasa (DDAB/DOPE) y DOTAP/DOPE (Boehringer). Pueden prepararse otros liposomas catiónicos a partir de materiales fácilmente disponibles usando técnicas muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Szoka (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4194-4198; documento WO 90/11092 para una descripción de la síntesis de liposomas de DOTAP (1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio)propano).

Similarmente, están fácilmente disponibles liposomas aniónicos y neutros, tales como de Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL), o pueden prepararse fácilmente usando materiales fácilmente disponibles. Tales materiales incluyen fosfatidilcolina, colesterol, fosfatidil-etanolamina, dioleoilfosfatidil-colina (DOPC), dioleoilfosfatidil-glicerol (DOPG), dioleoilfosfatidil-etanolamina (DOPE), entre otros. Estos materiales también pueden mezclarse con los materiales de partida DOTMA y DOTAP en relaciones apropiadas. Los métodos para preparar liposomas usando estos materiales son muy conocidos en la técnica.

Los liposomas pueden comprender vesículas multilaminares (MLV), vesículas unilaminares pequeñas (SUV) o vesículas unilaminares grandes (LUV). Los diversos complejos liposoma-ácido nucleico se preparan usando métodos conocidos en la técnica. Véanse por ejemplo, Straubinger (1983) *Meth. Immunol.* 101:512-527; Szoka (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4194-4198; Papahadjopoulos (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 394:483; Wilson (1979) *Cell* 17:77; Deamer & 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

5 Además, pueden incluirse lipoproteínas con el polinucleótido/polipéptido que va a administrarse. Ejemplos de lipoproteínas que van a utilizarse incluyen: quilomicrones, HDL, IDL, LDL y VLDL. También puede usarse mutantes, fragmentos o fusiones de estas proteínas. Por tanto, pueden usarse modificaciones de lipoproteínas que se producen naturalmente, tales como LDL acetilado. Estas lipoproteínas pueden dirigir la administración de polipéptidos a células que expresan receptores de lipoproteína. Preferentemente, si las lipoproteínas se incluyen con el polinucleótido que va a administrarse, no se incluye otro ligando dirigido en la composición.

15 Las lipoproteínas que se producen naturalmente comprenden un lípido y una porción de proteína. La porción de proteína se conoce como apoproteínas. En la actualidad, las apoproteínas A, B, C, D y E se han aislado e identificado. Al menos dos de éstas contienen varias proteínas, designadas por los números romanos AI, AII, AIV; CI, CII, CIII.

20 Una lipoproteína puede comprender más de una apoproteína. Por ejemplo, los quilomicrones que se producen naturalmente comprenden de A, B, C y E más veces que las lipoproteínas pierden A y adquieren apoproteínas C y E. VLDL comprende las apoproteínas A, B, C y E, VLDL comprende la apoproteína B; y HDL comprende las apoproteínas A, C y E.

25 El aminoácido de estas apoproteínas se conoce y se describe 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.

30 Las lipoproteínas contienen una variedad de lípidos que incluyen triglicéridos, colesterol (libre y éster) y fosfolípidos. La composición de los lípidos varía en las lipoproteínas que se producen naturalmente. Por ejemplo, los quilomicrones comprenden principalmente triglicéridos. Una descripción más detallada del contenido lipídico de las lipoproteínas que se producen naturalmente puede encontrarse, por ejemplo, en Meth. Enzymol. 128 (1986). La composición de los lípidos se elige para ayudar en la conformación de la apoproteína para la actividad de unión al receptor. La composición de los lípidos también puede elegirse para facilitar la interacción hidrófoba y la asociación con la molécula de unión al polinucleótido.

35 Las lipoproteínas que se producen naturalmente pueden aislarse de suero, por ejemplo, por ultracentrifugación. Tales métodos se describen en Meth. Enzymol (arriba); Pitas (1980) J. Biochem. 255:5454-5460 y Mahey (1979) J. Clin Invest. 64:743-750. También pueden producirse lipoproteínas por métodos recombinantes o *in vitro* por la expresión de los genes de apoproteína en una célula huésped deseada. Véase por ejemplo, Atkinson (1986) Annu Rev. Biophys Chem 15:403 y Radding (1958) Biochim Biophys Acta 30:443. Las lipoproteínas también pueden comprarse de proveedores comerciales, tales como Biomedical Technologies, Inc., Stoughton, Massachusetts, EE.UU. Puede encontrarse descripción adicional de las lipoproteínas en Zuckermann et al., documento WO 98/06437.

F. Agentes policatiónicos

45 Pueden incluirse agentes policatiónicos, con o sin lipoproteína, en una composición con el polinucleótido/polipéptido deseado que va a administrarse.

50 Los agentes policatiónicos normalmente presentan una carga positiva neta a pH relevante fisiológico y son capaces de neutralizar la carga eléctrica de los ácidos nucleicos para facilitar la administración a una localización deseada. Estos agentes tienen aplicaciones tanto *in vitro*, *ex vivo* como *in vivo*. Pueden usarse agentes policatiónicos para administrar ácidos nucleicos a un sujeto vivo tanto intramuscularmente, subcutáneamente, etc.

55 Lo siguiente 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 a ADN, proteínas cromosómicas no de histona, proteínas de revestimiento de virus de ADN, tales como (X174, los factores transcripcionales también contienen dominios que se unen a ADN y, por lo tanto, pueden ser útiles como agentes de condensación de ácido nucleico. Brevemente, factores transcripcionales tales como C/CEBP, c-jun, c-fos, AP-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.

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

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

Los agentes policatiónicos sintéticos que son útiles incluyen, por ejemplo, DEAE-dextrano, polibreno. Lipofectin y

LipofectAMINE™ son monómeros que forman complejos policatiónicos cuando se combinan con los polinucleótidos/polipéptidos.

Ensayos de inmunodiagnóstico

5 Los antígenos meningocócicos de la invención pueden usarse en inmunoensayos para detectar niveles de anticuerpos (o, en cambio, los anticuerpos anti-meningocócicos pueden usarse para detectar niveles de antígenos). Pueden desarrollarse inmunoensayos basados en antígenos recombinantes bien definidos para sustituir métodos de diagnóstico invasivos. Pueden detectarse anticuerpos para proteínas meningocócicas dentro de las muestras biológicas, incluyendo, por ejemplo, muestras de sangre o suero. El diseño de los inmunoensayos es sujeto a muchísima variación, y se conocen en la técnica una variedad de éstos. Los protocolos para el inmunoensayo pueden basarse, por ejemplo, en la competición, o reacción directa, o ensayos tipo sándwich. Por tanto, los protocolos pueden usar, por ejemplo, soportes sólidos, o pueden ser por inmunoprecipitación. La mayoría de los ensayos implica el uso de anticuerpo marcado o polipéptido; las marcas pueden ser, por ejemplo, moléculas fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivas o de colorante. También se conocen ensayos que amplifican las señales de la sonda; ejemplos de los cuales son ensayos que utilizan biotina y avidina, e inmunoensayos marcados y mediados con enzimas, tales como ensayos de ELISA.

20 Kits adecuados para inmunodiagnóstico y que contienen los reactivos marcados apropiados se construyen envasando 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.) requeridos para la realización del ensayo, además de un conjunto adecuado de instrucciones del ensayo.

MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

25 La secuencia de proteínas de 936-1 desvelada en las solicitudes internacional se ha sometido, entre otras cosas, a análisis informático para predecir los fragmentos peptídicos antigénicos dentro de las proteínas de longitud completa. Se han usado tres algoritmos en este análisis:

- 30 • **AMPHI** Se ha usado este programa para predecir los epítopes de linfocitos T [Gao et al. (1989) J. Immunol 143:3 007; Roberts et al. (1996) AIDS Res Hum Retrovir 12:593; Quakyi et al. (1992) Scand J Immunol suppl,11:9] y está disponible en el paquete Protean de DNASTAR, Inc. (1228 South Park Street, Madison, Wisconsin 53715 USA).
- 35 • **ÍNDICE ANTIGÉNICO** como se ha desvelado por Jameson & Wolf (1988). The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. CABIOS, 4:181:186
- 40 • **HIDROFILIA** como se ha desvelado por Hopp & Woods (1981) Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. PNAS, 78:3824-3828.

Los tres algoritmos identifican frecuentemente los mismos fragmentos. Tales fragmentos identificados de forma múltiple son particularmente preferidos. Los algoritmos frecuentemente identifican fragmentos que se solapan.

Fragmentos de proteína antigénicos preferidos

45 Las siguientes secuencias de aminoácidos en la Tabla 1 se identifican por títulos que indican el número asignado al marco de lectura abierto (ORF) particular, según aquellos designados en las solicitudes internacionales. Los títulos están en la siguiente forma: [no prefijo] [#], donde "no prefijo" significa una secuencia de *N. meningitidis* serotipo B; y "#" significa el número asignado a ese marco de lectura abierto (ORF). Por ejemplo, "936" se refiere a una secuencia de aminoácidos de *N. meningitidis* B, ORF número 936. La presencia de un sufijo "-1" al título indica una secuencia adicional encontrada para ese ORF particular. Así, "936-1" se refiere a una secuencia de aminoácidos de *N. meningitidis* B, ORF número 936, que es otra secuencia encontrada para ORF 936, además del ORF 936 originalmente designado. Cada secuencia de aminoácidos va precedida del número de posición de aminoácido inicial y seguida del número de posición de aminoácido final.

Tabla 1

936-1

Regiones de AMPHI - AMPHI

112-AlaGluGlyValTyrAsnTyrIleThrValAlaSerLeuProArgThrAlaGlyAspIleAlaGlyAsp-134

Índice antigénico - Jameson-Wolf

33-ValGlyAlaLysSerAlaValAspArgArgThrThrGlyAlaGlnThrAspAspAsnValMet-53

56-ArgIleGluThrThrAlaArgSerTyrLeuArgGlnAsnAsnGlnThrLysGlyTyr-74

124-LeuProArgThrAlaGlyAspIleAlaGlyAspThrTrpAsnThrserLysvalArgAla-143

Regiones hidrófilas - Hopp-Woods

37-SerAlaValAspArgArgThrThrGlyAlaGlnThrAspAspAsnValMet-53

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5
<110> NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L
<120> PÉPTIDOS ANTIGÉNICOS DE NEISSERIA
- 10
<130> P055440EP
<140> EP
<141> 30-10-2000
- 15
<150> US 60/162616
<151> 29-10-1999
<160> 27
- 20
<170> SeqWin99, versión 1.02
<210> 1
<211> 202
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis
- 25
<400> 1

ES 2 539 951 T3

1 Met Lys Pro Lys Pro His Thr Val Arg Thr Leu Ile Ala Ala Ile Phe
 5 Ser Leu Ala Leu Ser Gly Cys Val Ser Ala Val Ile Gly Ser Ala Ala
 10 Val Gly Ala Lys Ser Ala Val Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr
 15 Asp Asp Asn Val Met Ala Leu Arg Ile Glu Thr Thr Ala Arg Ser Tyr
 20 Leu Arg Gln Asn Asn Gln Thr Lys Gly Tyr Thr Pro Gln Ile Ser Val
 25 Val Gly Tyr Asn Arg His Leu Leu Leu Leu Gly Gln Val Ala Thr Glu
 30 Gly Glu Lys Gln Phe Val Gly Gln Ile Ala Arg Ser Glu Gln Ala Ala
 35 Glu Gly Val Tyr Asn Tyr Ile Thr Val Ala Ser Leu Pro Arg Thr Ala
 40 Gly Asp Ile Ala Gly Asp Thr Trp Asn Thr Ser Lys Val Arg Ala Thr
 45 Leu Leu Gly Ile Ser Pro Ala Thr Gln Ala Arg Val Lys Ile Val Thr
 50 Tyr Gly Asn Val Thr Tyr Val Met Gly Ile Leu Thr Pro Glu Glu Gln
 55 Ala Gln Ile Thr Gln Lys Val Ser Thr Thr Val Gly Val Gln Lys Val
 60 Ile Thr Leu Tyr Gln Asn Tyr Val Gln Arg
 65 195 200

40 <210> 2
 <211> 202
 <212> PRT
 <213> Neisseria gonorrhoeae
 45 <400> 2

ES 2 539 951 T3

Met Lys Pro Lys Pro His Thr Val Arg Thr Leu Ile Ala Ala Val Leu
 1 5 10 15

5 Ser Leu Ala Leu Gly Gly Cys Phe Ser Ala Val Val Gly Gly Ala Ala
 20 25 30

Val Gly Ala Lys Ser Val Ile Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr
 35 40 45

10 Asp Asp Asn Val Met Ala Leu Arg Ile Glu Thr Thr Ala Arg Ser Tyr
 50 55 60

Leu Arg Gln Asn Asn Gln Thr Lys Gly Tyr Thr Pro Gln Ile Ser Val
 65 70 75 80

15 Val Gly Tyr Asn Arg His Leu Leu Leu Leu Gly Gln Val Ala Thr Glu
 85 90 95

Gly Glu Lys Gln Phe Val Gly Gln Ile Ala Arg Ser Glu Gln Ala Ala
 100 105 110

20 Glu Gly Val Tyr Asn Tyr Ile Thr Val Ala Ser Leu Pro Arg Thr Ala
 115 120 125

25 Gly Asp Ile Ala Gly Asp Thr Trp Asn Thr Ser Lys Val Arg Ala Thr
 130 135 140

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

30 Tyr Gly Asn Val Thr Tyr Val Met Gly Ile Leu Thr Pro Glu Glu Gln
 165 170 175

Ala Gln Ile Thr Gln Lys Val Ser Thr Thr Val Gly Val Gln Lys Val
 180 185 190

35 Ile Thr Leu Tyr Gln Asn Tyr Val Gln Arg
 195 200

<210> 3
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

40 <400> 3

45 Met Lys Pro Lys Pro His Thr Val Arg Thr Leu Ile Ala Ala Ile Phe
 1 5 10 15

Ser Leu Ala Leu Ser Gly Cys Val Ser Ala Val Ile Gly Ser Ala Ala
 20 25 30

50 Val Gly Ala Lys Ser Ala Val Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr
 35 40 45

Asp Asp Asn Val Met Ala Leu Arg Ile Glu Thr Thr Ala Arg Ser Tyr
 50 55 60

55 Leu Arg Gln Asn Asn Gln Thr Lys Gly Tyr Thr Pro Gln Ile Ser Val
 65 70 75 80

60 Val Gly Tyr Asn Arg His Leu Leu Leu Leu Gly Gln Val Ala Thr Glu
 85 90 95

Gly Glu Lys Gln Phe Val Gly Gln Ile Ala Arg Ser Glu Gln Ala Ala
 100 105 110

65 Glu Gly Val Tyr Asn Tyr Ile Thr Val Ala Ser Leu Pro Arg Thr Ala
 115 120 125

ES 2 539 951 T3

<210> 4
 <211> 202
 <212> PRT
 5 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 4
 10 Met Lys Pro Lys Pro His Thr Val Arg Thr Leu Thr Ala Ala Val Leu
 1 5 10
 Ser Leu Ala Leu Gly Gly Cys Val Ser Ala Val Val Gly Gly Ala Ala
 20 25 30
 15 Val Gly Ala Lys Ser Ala Val Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr
 35 40 45
 Asp Asp Asn Val Met Ala Leu Arg Ile Glu Thr Thr Ala Arg Ser Tyr
 50 55 60
 20 Leu Arg Gln Asn Asn Gln Thr Lys Gly Tyr Thr Pro Gln Ile Ser Val
 65 70 75 80
 Val Gly Tyr Asn Arg His Leu Leu Leu Leu Gly Gln Val Ala Thr Glu
 85 90 95
 25 Gly Glu Lys Gln Phe Val Gly Gln Ile Ala Arg Ser Glu Gln Ala Ala
 100 105 110
 Glu Gly Val Tyr Asn Tyr Ile Thr Val Ala Ser Leu Pro Arg Thr Ala
 115 120 125
 30 Gly Asp Ile Ala Gly Asp Thr Trp Asn Thr Ser Lys Val Arg Ala Thr
 130 135 140
 35 Leu Leu Gly Ile Ser Pro Ala Thr Gln Ala Arg Val Lys Ile Val Thr
 145 150 155 160
 Tyr Gly Asn Val Thr Tyr Val Met Gly Ile Leu Thr Pro Glu Glu Gln
 165 170 175
 40 Ala Gln Ile Thr Gln Lys Val Ser Thr Thr Val Gly Val Gln Lys Val
 180 185 190
 Ile Thr Leu Tyr Gln Asn Tyr Val Gln Arg
 195 200
 45 <210> 5
 <211> 202
 <212> PRT
 50 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 5

ES 2 539 951 T3

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

40 <210> 6
 <211> 202
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

45 <400> 6

Met Lys Pro Lys Pro His Thr Val Arg Thr Leu Thr Ala Ala Val Leu
 1 5 10 15
 50 Ser Leu Ala Leu Gly Gly Cys Val Ser Ala Val Val Gly Gly Ala Ala
 20 25 30
 Val Gly Ala Lys Ser Ala Val Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr
 35 40 45

ES 2 539 951 T3

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

30 <210> 7
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Fragmento de proteína

40 <400> 7
 Thr Leu Ile Ala Ala Ile
 1 5

45 <210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Fragmento de proteína

<400> 8
 Gly Cys Val Ser Ala Val
 1 5

55 <210> 9
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Fragmento de proteína

65 <400> 9

ES 2 539 951 T3

Gln Phe Val Gly Gln Ile
1 5

5 <210> 10
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Fragmento de proteína

<400> 10

15 Ala Glu Gly Val Tyr Asn Tyr Ile Thr Val Ala Ser Leu Pro Arg Thr
1 5 10 15

Ala Gly Asp Ile Ala Gly Asp
20

20 <210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Fragmento de proteína

<400> 11

30 Met Lys Pro Lys Pro His Thr Val
1 5

35 <210> 12
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Fragmento de proteína

<400> 12

45 Val Gly Ala Lys Ser Ala Val Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr
1 5 10 15

Asp Asp Asn Val Met
20

50 <210> 13
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Fragmento de proteína

<400> 13

60 Arg Ile Glu Thr Thr Ala Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Asn Asn Gln Thr
1 5 10 15

Lys Gly Tyr

65 <210> 14
<211> 8

ES 2 539 951 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Fragmento de proteína
 <400> 14

 Ala Thr Glu Gly Glu Lys Gln Phe
 1 5
 10
 <210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Fragmento de proteína

 <400> 15
 20
 Ala Arg Ser Glu Gln Ala Ala
 1 5

 <210> 16
 25 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Fragmento de proteína

 <400> 16

 Leu Pro Arg Thr Ala Gly Asp Ile Ala Gly Asp Thr Trp Asn Thr Ser
 35 1 5 10 15
 Lys Val Arg Ala
 20
 40
 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Fragmento de proteína

 <400> 17
 50
 Ser Pro Ala Thr Gln Ala Arg Val Lys
 1 5

 <210> 18
 55 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Fragmento de proteína
 60
 <400> 18

 Thr Pro Glu Glu Gln Ala Gln Ile Thr
 65 1 5

 <210> 19

ES 2 539 951 T3

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Fragmento de proteína
 <400> 19
 Met Lys Pro Lys Pro His Thr
 10 1 5
 <210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fragmento de proteína
 20 <400> 20
 Ser Ala Val Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr Asp Asp Asn Val
 1 5 10 15
 25 Met
 <210> 21
 <211> 6
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fragmento de proteína
 35 <400> 21
 Arg Ile Glu Thr Thr Ala
 1 5
 40 <210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Fragmento de proteína
 <400> 22
 50 Asn Asn Gln Thr Lys Gly Tyr
 1 5
 <210> 23
 <211> 8
 55 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fragmento de proteína
 60 <400> 23
 Ala Thr Glu Gly Glu Lys Gln Phe
 1 5
 65 <210> 24

ES 2 539 951 T3

<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Fragmento de proteína

<400> 24

10 Ala Arg Ser Glu Gln Ala Ala
1 5

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Fragmento de proteína

20 <400> 25

25 Pro Arg Thr Ala Gly
1 5

<210> 26
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Fragmento de proteína

35 <400> 26

Thr His Arg Gly Leu Asn Ala Leu Ala Ala Arg Gly Val Ala Leu Leu
1 5 10 15

Tyr Ser

40 <210> 27
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Fragmento de proteína

50 <400> 27

Thr Pro Glu Glu Gln Ala Gln Ile
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una proteína que comprende uno o más fragmentos de SEC ID N°: 2884 del documento WO99/51280 (MKPKPHTVRTLIAAIFSLALSGCVSAVIGSAAVGAksAVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSYLQRQNNQTKGYTPQI SVVGYNRHLLLLGQVATEGEKQFVGQIARSEQAAEGVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSKVRATLLGISPATQARV KIVTYG NVTYVMGILTPEEQAQITQKVSTTVGVQKVITLYQNYVQR), en la que dicho(s) fragmento(s):

- (a) comprenden al menos un determinante antigénico; y
- (b) comprenden una secuencia seleccionada de:

10 112-AlaGluGlyValTyrAsnTyrIleThrValAlaSerLeuProArgThrAlaGlyAspIleAlaGlyAsp-134
33-ValGlyAlaLysSerAlaValAspArgArgThrThrGlyAlaGlnThrAspAspAsnValMet-53
56-ArgIleGluThrThrAlaArgSerTyrLeuArgGlnAsnAsnGlnThrLysGlyTyr-74
124-LeuProArgThrAlaGlyAspIleAlaGlyAspThrTrpAsnThrSerLysValArgAla-143
15 37-SerAlaValAspArgArgThrThrGlyAlaGlnThrAspAspAsnValMet-53

y en la que dicha proteína no es SEC ID N°: 2876, 2878, 2880, 2882, 2884 o 2886 del documento WO99/57280

2. Un anticuerpo que reconoce el fragmento como se define en la reivindicación 1.