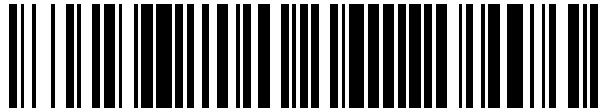


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 317**

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 10178508 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2275552**

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:

**11.02.2016**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)  
Rue de l'Institut 89  
1330 Rixensart, BE**

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:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 559 317 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*

La presente invención se refiere a secuencias de péptidos antigénicos de la bacteria *Neisseria meningitidis*.

## Técnica anterior

5 *N. meningitidis* es un diplococo Gram-negativo, no móvil que es patógeno en seres humano.

Basándose en el polisacárido capsular del organismo, se han identificado 12 serogrupos de *N. meningitidis*. El grupo A es el patógeno que más a menudo está implicado en la enfermedad epidémica en el África subsahariana. Los serogrupos B y C son responsables de la amplia mayoría de casos en EEUU y en la mayoría de los países desarrollados. Los serogrupos W135 e Y son responsables del resto de los casos en EEUU y los países desarrollados.

La vacuna meningocócica que se emplea en la actualidad es una vacuna de polisacáridos tetravalente compuesta por los serogrupos A, C, Y y W135. Sin embargo, el meningococo B sigue siendo un problema. La estrategia de los polisacáridos no puede emplearse porque el polisacárido capsular menB es un polímero de un ácido *N*-acetilneuramínico con enlace  $\alpha(2-8)$  que también está presente en tejido de mamíferos. Una estrategia para obtener una vacuna de menB emplea 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, J.T. (1992), Development of a meningococcal vaccine, Infect. Agents Dis., 4:13-28]. Otras proteínas usadas en vacunas de membrana externa han sido las proteínas opa y opc, pero ninguna de estas estrategias ha sido capaz de superar la variabilidad antigénica [por ejemplo, Ala'Aldeen y Borriello (1996)]. Las proteínas de unión a transferrina meningocócicas 1 y 2 están expuestas sobre la superficie y generan anticuerpos bactericidas capaces de destruir cepas homólogas y heterólogas [Vaccine, 14(1):49-53].

## Divulgación de la invención

La invención se refiere a fragmentos de la proteína 287-1 divulgada en las solicitudes de patente internacional WO99/57280 y WO00/22430 (las "solicitudes internacionales"), en los que los fragmentos comprenden al menos un determinante antigénico y se seleccionan de entre los 22 fragmentos de la reivindicación 1 y la invención proporciona proteínas que comprenden uno o más de estos 22 fragmentos.

La invención se somete a la condición de que no incluya, dentro de su ámbito proteínas limitadas a cualquiera de las secuencias de proteínas de longitud completa descritas en la solicitudes internacionales (es decir, las secuencias pares de SEC ID: 2-3020 del documento WO99/57280 y las secuencias impares de SEC ID:963-1045 del documento WO00/22430).

Por supuesto, las proteínas de la invención pueden prepararse por diversos medios (por ejemplo, expresión recombinante, purificación a partir de un cultivo celular, síntesis química, etc.) y en diversas formas (por ejemplo, nativas, fusiones C-terminales y/o N-terminales, etc.). Preferiblemente se preparan en forma sustancialmente pura (es decir, sustancialmente exenta de otras proteínas de *Neisseria* o de la célula huésped). Las proteínas cortas se producen preferiblemente empleando la síntesis química de péptidos.

De acuerdo con 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 ámbito anticuerpos que reconozcan cualquiera de las secuencias de proteínas completas en las solicitudes internacionales. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales y pueden ser producidos por cualquier medio adecuado.

Las composiciones que comprenden proteínas y/o anticuerpos de acuerdo con la invención pueden ser adecuadas como vacunas, por ejemplo, o como reactivos de diagnóstico, o como composiciones inmunógenas.

Las proteínas o los anticuerpos según la invención pueden emplearse como medicamentos (por ejemplo, como vacunas o como composiciones inmunógenas) o como reactivos de diagnóstico. Pueden emplearse para la fabricación de: (i) un medicamento para tratar o prevenir una infección debida a bacterias de *Neisseria*; (ii) un reactivo de diagnóstico para detectar la presencia de bacterias de *Neisseria* o de anticuerpos generados contra bacterias de *Neisseria*; y/o (iii) un reactivo que puede generar anticuerpos contra bacterias de *Neisseria*. Dichas bacterias de *Neisseria* pueden ser de cualquier especie o cepa (tal como *N. gonorrhoeae*), pero son preferiblemente *N. meningitidis*, en especial la cepa A o la cepa B.

La divulgación también proporciona un procedimiento para tratar un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un ácido nucleico, una proteína y/o un anticuerpo de acuerdo con la invención. A continuación se ofrece un sumario de las técnicas y procedimientos convencionales que

pueden emplearse para realizar la invención (por ejemplo, para utilizar las secuencias descritas para objetivos de vacunación o de diagnóstico). Este sumario no es una limitación de la invención, sino que, más bien, proporciona ejemplos que pueden emplearse, pero que no son necesarios.

#### Descripción general

- 5 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 de la técnica. Tales técnicas se explican en profundidad en la bibliografía, por ejemplo, Sambrook Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 2ª edición (1989); DNA Cloning, volúmenes I y II (D.N. Glover, ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames y S.J. Higgins, eds., 1984); Transcription and Translation (B.D. Hames y S.J. Higgins, eds., 1984); Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); la serie Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.), en especial los volúmenes 154 y 155; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.H. Miller y M.P. Calos, eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Mayer y Walker, eds. (1987), Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, Londres); Scopes (1987), Protein Purification: Principles and Practice, 2ª edición (Springer-Verlag, N.Y.) y Handbook of Experimental Immunology, volúmenes I-IV (D.M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986).

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

#### Definiciones

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

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.

La expresión "determinante antigénico" incluye epitopos de células B y epitopos de células T.

- 25 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, estos pueden actuar juntos, como cuando un promotor heterólogo con un gen está unido de manera funcional al gen. Otro ejemplo es cuando una secuencia meningocócica es heteróloga a una célula huésped de ratón. Otros ejemplos serían dos epitopos procedentes de una misma proteína o de proteínas diferentes que se han ensamblado en una única proteína en una disposición que no se encuentra en la naturaleza.

- 30 Un "origen de la replicación" es una secuencia polinucleotídica que inicia y regula la replicación de polinucleótidos, tales como un vector de expresión. El origen de la replicación se comporta como una unidad autónoma de replicación de polinucleótidos dentro de una célula y es capaz de replicación sometido a su propio control. Un origen de la replicación puede ser necesario para que un vector se replique en una célula huésped concreta. Con ciertos orígenes de la replicación, un vector de expresión puede reproducirse con un alto número de copias en presencia de proteínas apropiadas dentro de la célula. Ejemplos de orígenes son las secuencias de replicación autónoma que son eficaces en levaduras; y el antígeno T vírico, que es eficaz en células COS-7.

#### Sistemas de expresión

- 40 Las secuencias de nucleótidos meningocócicas pueden expresarse en una diversidad de sistemas de expresión diferentes, por ejemplo, los utilizados con células de mamífero, baculovirus, plantas, bacterias y levaduras.

##### i. Sistemas de mamífero

- En la técnica se conocen los sistemas de expresión de mamíferos. Un promotor de mamífero es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa de mamífero e iniciar la transcripción secuencia abajo (3') de una secuencia codificadora (por ejemplo, un gen estructural) para producir ARNm. Un promotor presentará una región de inicio de la transcripción, que normalmente está colocada proximal al extremo 5' de la secuencia codificadora y una caja TATA, habitualmente localizada a 25-30 pares de bases (pb) secuencia arriba del sitio de inicio de la transcripción. Se cree que esta caja TATA dirige a la ARN polimerasa II para que comience la síntesis de ARN en el sitio correcto. Un promotor de mamífero también contendrá un elemento promotor secuencia arriba, habitualmente localizado dentro de 100 a 200 pb secuencia arriba de la caja TATA. Un elemento promotor secuencia arriba determina la velocidad a la que se inicia la transcripción y puede actuar en cualquiera de las dos orientaciones [Sambrook et al. (1989), "Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells", en Molecular Cloning: A

Laboratory Manual, 2ª ed.].

Los genes víricos de mamífero a menudo son altamente expresados y tienen un amplio abanico de huéspedes; por tanto, las secuencias que codifican genes víricos de mamífero proporcionan secuencias de promotores particularmente útiles. Los ejemplos incluyen el promotor temprano de SV40, el promotor de LTR del virus del tumor mamario de ratón, el promotor tardío mayor de adenovirus (Ad MLP) y el promotor del virus del herpes simplex. Además, secuencias derivadas de genes no víricos, tales como el gen de metaloteioneína murino, también proporcionan secuencias de promotes útiles. La expresión puede ser constitutiva o regulada (inducible), dependiendo de que el promotor pueda ser inducido con glucocorticoides en células que responden 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 ARN reguladora que puede estimular la transcripción hasta 1000 veces cuando está unida a promotores homólogos o heterólogos, comenzando la síntesis en el sitio de inicio normal del ARN. Los potenciadores también son activos cuando se colocan secuencia arriba o secuencia abajo del sitio de inicio de la transcripción, en orientación normal o invertida, o a una distancia de más de 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 de potenciadores derivados de virus pueden ser particularmente útiles, porque normalmente tienen un abanico mayor de huéspedes. Los ejemplos incluyen el potenciador del gen temprano de 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]. Además, algunos potenciadores son regulables y se convierten en activos solo en presencia de un inductor, tal como una hormona o un ion metálico [Sassone-Corsi y Borelli (1986), *Trends Genet.*, 2:215; Maniatis et al. (1987), *Science* 236:1237].

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

Como alternativa, se pueden segregar proteínas extrañas desde las células en el medio de crecimiento mediante la creación de moléculas de ADN quiméricas que codifican una proteína de fusión que consta de un fragmento de una secuencia líder que proporciona la secreción de la proteína extraña en células de mamífero. Preferiblemente, hay sitios de procesamiento codificados entre el fragmento líder y el gen extraño que pueden escindirse *in vivo* o *in vitro*. El fragmento de la secuencia líder normalmente codifica un péptido señal que consta de aminoácidos hidrófobos que dirige la secreción de la proteína desde la célula. El líder tripartito de adenovirus es un ejemplo de una secuencia líder que proporciona la secreción de una proteína extraña en células de mamífero.

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

Habitualmente, los componentes descritos anteriormente, que comprenden una secuencia de promotor, de señal de poliadenilación y de terminación de la transcripción, se juntan en construcciones de expresión. Si se desea, también pueden incluirse en una construcción de expresión potenciadores, intrones con sitios donantes y aceptores de corte y empalme funcionales y secuencias líder. Las construcciones de expresión a menudo se mantienen en un replicón, tal como un elemento extracromosómico (por ejemplo, plásmidos), capaz de un mantenimiento estable en un huésped, tal como una célula de mamífero o una bacteria. Los sistemas de replicación de mamífero incluyen los derivados de virus animales, que requiere factores de acción en trans para replicarse. Por ejemplo, los plásmidos que contienen los sistemas de replicación de papovavirus, tales como SV40 [Gluzman (1981), *Cell*, 23:175] o poliomasvirus, se replican con un número de copias extremadamente alto en presencia del antígeno T vírico apropiado. Ejemplos adicionales de replicones de mamífero incluyen los derivados del papilomavirus bovino y el virus de Epstein-Barr. Además, el replicón puede presentar 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 la amplificación. Los ejemplos de estos vectores lanzadera de mamíferos-bacterias 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 empleado depende del huésped que se va a transformar. Los procedimientos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero se conocen en la técnica e incluyen la transfección mediada por dextrano, la precipitación con fosfato de calcio, la transfección mediada por polibreno, la fusión de protoplastos, la electroporación, la encapsulación del polinucleótido o polinucleótidos en liposomas y la microinyección directa del ADN en los núcleos.

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

## ii. Sistemas de baculovirus

El polinucleótido que codifica la proteína también puede insertarse en un vector de expresión de insectos adecuado y se une de manera funcional a los elementos de control dentro de ese vector. La construcción del vector emplea técnicas que son conocidas en la técnica. En general, los componentes del sistema de expresión incluyen un vector de transferencia, habitualmente 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 se van a expresar; un baculovirus de tipo silvestre con una secuencia homóloga a la del fragmento específico de baculovirus en el vector de transferencia (esto permite la recombinación homóloga del gen heterólogo con el genoma del baculovirus); y células huéspedes de insecto y medios de crecimiento adecuados.

Después de insertar la secuencia de ADN que codifica la proteína en el vector de transferencia, el vector y el genoma vírico de tipo silvestre se transfecan en una célula huésped de insecto, dentro de la que se permite que el vector y el genoma vírico se recombinen. El virus recombinante encapsulado se expresa y las placas recombinantes se identifican y se purifican. Los materiales y los procedimientos para los sistemas de expresión de baculovirus/células de insecto están disponibles en el mercado en forma de kit, entre otros, en Invitrogen, San Diego, CA (kit "MaxBac"). En general, los expertos en la técnica conocen estas técnicas y se describen en profundidad en Summers y Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin N.º: 1555 (1987) (en lo sucesivo "Summers y Smith").

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

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

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

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

Los genes estructurales, que son transcritos en abundancia en las fases tardías del ciclo de infección vírico, proporcionan secuencias de promotores particularmente útiles. Los ejemplos incluyen secuencias derivadas del

gen que codifica la proteína de polihedrina vírica (Friesen et al. (1986), "The Regulation of Baculovirus Gene Expression", en: *The Molecular Biology of Baculoviruses* (ed. Walter Doerfler); publicaciones EPO n.ºs 127.839 y 155.476) y el gen que codifica la proteína p10 (Vlak et al. (1988), *J. Gen. Virol.*, 69:765).

5 El ADN que codifica las secuencias señal adecuadas puede derivarse de genes para proteínas de insecto o baculovirus segregadas, tales como el gen de polihedrina de baculovirus (Carbonell et al. (1988), *Gene*, 73:409). Como alternativa, puesto que las señales para las modificaciones postraduccionales de células de mamífero (tales como la ruptura de péptidos señal, la ruptura proteolítica y la fosforilación) parecen ser reconocidas por las células de insecto y puesto que las señales requeridas para la secreción y la acumulación nuclear también parecen estar conservadas entre las células de invertebrados y las células de vertebrados, también es posible utilizar líderes con un origen que no sea de insecto, tales como los derivados de genes que codifican el interferón humano (Maeda et al. (1985), *Nature*, 315:592); el péptido liberador de gastrina humano (Lebacqz-Verheyden et al. (1988), *Molec. Cell. Biol.*, 8:3129); la IL-2 humana (Smith et al. (1985), *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 82:8404); la IL-3 de ratón (Miyajima et al. (1987), *Gene*, 58:273); y la glucocerebrosidasa humana (Martin et al. (1988), *DNA*, 7:99) para proporcionar la secreción en insectos.

15 Una poliproteína o un polipéptido recombinante puede expresarse de modo intracelular o, si se expresa con las secuencias reguladoras apropiadas, puede ser secretado. La correcta expresión intracelular de proteínas extrañas no fusionadas habitualmente requiere genes heterólogos que de modo ideal tienen una secuencia líder corta que contiene señales de inicio de la traducción adecuadas que preceden a una señal de inicio ATG. Si se desea, la metionina en el N-terminal puede escindirse de la proteína madura mediante una incubación *in vitro* con bromuro de cianógeno.

20 Como alternativa, las proteínas o poliproteínas recombinantes que no son segregadas en la naturaleza pueden segregarse a partir de la célula de insecto creando moléculas de ADN quiméricas que codifiquen una proteína de fusión formada por un fragmento de secuencia líder que proporcione la secreción de la proteína extraña en insectos. El fragmento de secuencia líder habitualmente codifica un péptido señal compuesto de aminoácidos hidrófobos que dirigen la translocación de la proteína dentro del retículo endoplásmico.

25 Después de la inserción de la secuencia de ADN y/o del gen que codifica el precursor del producto de la expresión de la proteína, una célula huésped de insecto se cotransforma con el ADN heterólogo del vector de transferencia y el ADN genómico del baculovirus de tipo silvestre -habitualmente mediante cotransfección. La secuencia del promotor y la secuencia de terminación de la transcripción de la construcción habitualmente comprenden una sección de 2-5 kb del genoma de baculovirus. Los procedimientos para introducir ADN heterólogo en el sitio deseado en el virus de baculovirus son conocidos en la técnica (véase Summers y Smith, *supra*; Ju et al. (1987); Smith et al., *Mol. Cell. Biol.* (1983), 3:2156; y Luckow y Summers (1989)). Por ejemplo, la inserción puede realizarse en un gen tal como el gen de polihedrina, mediante recombinación de entrecruzamiento doble homóloga; la inserción también puede realizarse en un sitio de enzima de restricción modificado en el gen de baculovirus deseado (Miller et al. (1989), *Bioessays*, 4:91). La secuencia de ADN, cuando se clona en el lugar del gen de polihedrina en el vector de expresión, está flanqueada en 5' y 3' por secuencias específicas de polihedrina y se coloca secuencia abajo del promotor de polihedrina.

30 El vector de expresión de baculovirus recién formado después se encapsula en un baculovirus recombinante infeccioso. La recombinación homóloga se produce con una frecuencia baja (entre aproximadamente el 1% y aprox el 5%); por tanto, la mayor parte del virus producido después de la cotransfección sigue siendo un virus de tipo silvestre. Por tanto, es necesario un procedimiento para identificar los virus recombinantes. Una ventaja del sistema de expresión es una selección visual que permite distinguir a los virus recombinantes. La proteína de polihedrina, que es producida por el virus nativo, se produce a unos niveles muy altos en los núcleos de las células infectadas en las fases tardías después de la infección vírica. La proteína de polihedrina acumulada forma cuerpos de oclusión que también contienen partículas embebidas. Estos cuerpos de oclusión, con un tamaño de hasta 15 m, son muy refractarios, lo que les confiere un aspecto brillante que se puede visualizar con facilidad con un microscopio óptico. Las células infectadas con los virus recombinantes carecen de cuerpos de oclusión. Para distinguir el virus recombinante del virus de tipo silvestre, el sobrenadante de la transfección se cultiva sobre una monocapa de células de insecto mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Concretamente, las placas se seleccionan con un microscopio óptico para detectar la presencia (que indica un virus de tipo silvestre) o la ausencia (que indica un virus recombinante) de cuerpos de oclusión ("*Current Protocols in Microbiology*", vol. 2 (Ausubel et al., eds.) en 16.8 (sup. 10, 1990); Summers y Smith, *supra*; Miller et al. (1989)).

40 El vector de expresión de baculovirus recién formado después se encapsula en un baculovirus recombinante infeccioso. La recombinación homóloga se produce con una frecuencia baja (entre aproximadamente el 1% y aprox el 5%); por tanto, la mayor parte del virus producido después de la cotransfección sigue siendo un virus de tipo silvestre. Por tanto, es necesario un procedimiento para identificar los virus recombinantes. Una ventaja del sistema de expresión es una selección visual que permite distinguir a los virus recombinantes. La proteína de polihedrina, que es producida por el virus nativo, se produce a unos niveles muy altos en los núcleos de las células infectadas en las fases tardías después de la infección vírica. La proteína de polihedrina acumulada forma cuerpos de oclusión que también contienen partículas embebidas. Estos cuerpos de oclusión, con un tamaño de hasta 15 m, son muy refractarios, lo que les confiere un aspecto brillante que se puede visualizar con facilidad con un microscopio óptico. Las células infectadas con los virus recombinantes carecen de cuerpos de oclusión. Para distinguir el virus recombinante del virus de tipo silvestre, el sobrenadante de la transfección se cultiva sobre una monocapa de células de insecto mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Concretamente, las placas se seleccionan con un microscopio óptico para detectar la presencia (que indica un virus de tipo silvestre) o la ausencia (que indica un virus recombinante) de cuerpos de oclusión ("*Current Protocols in Microbiology*", vol. 2 (Ausubel et al., eds.) en 16.8 (sup. 10, 1990); Summers y Smith, *supra*; Miller et al. (1989)).

55 Se han desarrollado vectores de expresión de baculovirus recombinantes para la infección en varias células de insecto. Por ejemplo, se han desarrollado baculovirus recombinantes, entre otros, para *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 (1986), *Nature*, 321:718; Smith et al. (1983), *Mol. Cell. Biol.*, 3:2156; y véase en general, Fraser, et al. (1989), *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 25:225).

Las células y los medios de cultivo celular están disponibles en el mercado para la expresión directa y de fusión de polipéptidos heterólogos en un sistema de expresión/baculovirus; los expertos en la técnica conocen en general la tecnología del cultivo celular. Véase, por ejemplo, Summers y Smith, *supra*.

5 Después las células de insecto modificadas pueden cultivarse en un medio nutriente apropiado, que permita el mantenimiento estable del plásmido o plásmidos presentes en el huésped de insecto modificado. Donde el gen del producto de la expresión está sometido a un control inducible, el huésped puede cultivarse hasta una alta densidad y se induce la expresión. Como alternativa, cuando la expresión es constitutiva, el producto se expresará continuamente hacia el medio y el medio nutriente debe mantenerse continuamente en circulación, mientras se retira el producto de interés y se introducen los nutrientes gastados. El producto puede purificarse mediante técnicas tales como la cromatografía, por ejemplo, HPLC, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, etc.; electroforesis; centrifugación en gradiente de densidad; extracción con disolventes, o similares. Según sea apropiado, el producto puede purificarse aún más, según sea necesario, para eliminar sustancialmente cualquier proteína de insecto que también haya sido segregada hacia el medio o que sea el resultado de la lisis de las células de insecto, para proporcionar un producto que está al menos sustancialmente exento de restos del huésped, por ejemplo, proteínas, lípidos y polisacáridos.

Para obtener la expresión de las proteínas, las células huéspedes recombinantes derivadas de los transformantes se incuban en condiciones que permitan la expresión de la secuencia codificadora de la proteína recombinante. Estas condiciones variarán dependiendo de la célula huésped seleccionada. Sin embargo, estas condiciones son fácilmente determinables para los expertos en la técnica, basándose en lo que se conoce en la técnica.

### 20 iii. Sistemas vegetales

Existen muchos cultivos de células vegetales y sistemas de expresión genética en plantas completas conocidos en la técnica. Los ejemplos de sistemas de expresión genética celular vegetales incluyen los descritos en patentes, tales como: US 5.693.506; US 5.659.122; y US 5.608.143. Otros ejemplos de expresión genética en cultivo de células vegetales se han descrito en Zenk, *Phytochemistry*, 30:3861-3863 (1991). Pueden encontrarse descripciones de péptidos señal de proteínas vegetales, además de las referencias bibliográficas indicadas 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). Puede encontrarse una descripción de la regulación de la expresión de genes vegetales por la fitohormona ácido giberélico y enzimas segregadas inducidas por el ácido giberélico en R.L. Jones y J. MacMillin, Gibberellins, en: *Advanced Plant Physiology*, Malcolm B. Wilkins, ed., 1984, Pitman Publishing Limited, Londres, páginas 21-52. Otras referencias bibliográficas que describen otros genes metabólicamente regulados son: 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).

35 Generalmente, empleando técnicas conocidas en la técnica, una secuencia polinucleotídica deseada se inserta en un módulo de expresión que comprende elementos reguladores genéticos diseñados para su funcionamiento en plantas. El módulo de expresión se inserta en un vector de expresión deseado con secuencias acompañantes secuencia arriba y secuencia abajo del módulo de expresión adecuado para la expresión en un huésped vegetal. Las secuencias acompañantes tendrán un origen plasmídico o vírico y proporcionan las características necesarias al vector que permiten a los vectores mover ADN desde un huésped de clonación original, tal como una bacteria, hacia el huésped vegetal deseado. La construcción de vector de bacteria/planta básica preferiblemente proporcionará un origen de la replicación procarionta de amplio abanico de huéspedes; un marcador seleccionable procarionta; y para transformaciones con *Agrobacterium*, secuencias de ADN T para la transferencia mediada por *Agrobacterium* a cromosomas vegetales. Donde el gen heterólogo no está dispuesto de forma que se pueda detectar fácilmente, la construcción preferiblemente también presentará un gen marcador seleccionable para determinar si una célula vegetal ha sido transformada. Un análisis general de los marcadores adecuados, por ejemplo, para los miembros de la familia de las gramíneas, se encuentra en Wilmink y Dons, 1993, *Plant Mol. Biol. Repr.*, 11(2):165-185.

50 También se recomiendan secuencias adecuadas para permitir la integración de la secuencia heteróloga en el genoma vegetal. Estas pueden incluir secuencias de transposones y similares para la recombinación homóloga, así como secuencias Ti que permitan la inserción aleatoria de un módulo de expresión heterólogo en un genoma vegetal. Los marcadores seleccionables procariontas adecuados incluyen la resistencia hacia antibióticos, tales como ampicilina o tetraciclina. Otras secuencias de ADN que codifican otras funciones también pueden estar presentes en el vector, tal como se conoce en la técnica.

55 Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden incluirse en un módulo de expresión para la expresión de la proteína o proteínas de interés. Habitualmente, solo habrá un único módulo de expresión, aunque

son factibles dos o más. El módulo de expresión recombinante contendrá, además de la secuencia codificadora de la proteína heteróloga, los siguientes elementos: una región de promotor, secuencias no traducidas 5' vegetales, un codón de iniciación dependiendo de que el gen estructural esté o no equipado con uno y una secuencia de terminación de la transcripción y la traducción. Unos sitios de enzimas de restricción exclusivos en los extremos 5' y 3' del módulo permiten una fácil inserción en un vector preexistente.

Una secuencia codificadora heteróloga puede ser para cualquier proteína relacionada con la presente invención. La secuencia que codifica la proteína de interés codificará un péptido señal que permita el procesamiento y la translocación de la proteína, según sea apropiado y habitualmente carecerá de cualquier secuencia que puede provocar la unión de la proteína deseada de la invención con una membrana. Puesto que, en su mayor parte, la región de inicio de la transcripción es para un gen que se expresa y se transloca durante la germinación, mediante el uso del péptido señal que proporciona la translocación, alguien puede proporcionar también la translocación de la proteína de interés. De esta manera, la proteína o proteínas de interés se translocarán desde las células en las que se expresan y pueden recolectarse de modo eficaz. Generalmente, la secreción en semillas se realiza a través de la aleurona o capa de epitelio escutelar en el endospermo de la semilla. Aunque no es necesario que la proteína se segregue desde las células en las que se produce, esto facilita el aislamiento y la purificación de la proteína recombinante.

Puesto que la expresión final del producto génico deseado se realizará en una célula eucariota es deseable determinar si alguna porción del gen clonado contiene secuencias que serán procesadas y eliminadas en forma de intrones por la maquinaria del espliceosoma del huésped. Si esto es así, puede realizarse una mutagénesis dirigida específica de sitio de la región del "intrón" para evitar perder una porción del mensaje genético como un código de intrón falso (Reed y Maniatis, Cell, 41:95-105, 1985).

El vector puede microinyectarse directamente en las células vegetales empleando micropipetas para transferir mecánicamente el ADN recombinante (Crossway, Mol. Gen. Genet., 202:179-185, 1985). El material genético también puede transferirse a la célula vegetal empleando polietilenglicol (Krens, et al., Nature, 296, 72-74, 1982). Otro procedimiento para la introducción de segmentos de ácidos nucleicos es la penetración balística a alta velocidad mediante partículas pequeñas con el ácido nucleico introducido en la matriz de las partículas o esferas pequeñas, o sobre la superficie. Klein, et al., Nature, 327, 70-73, 1987 y Knudsen y Muller, 1991, Planta, 185:330-336 divulgan el bombardeo con partículas del endospermo de la cebada para crear cebada transgénica. Otro procedimiento para la introducción es la fusión de protoplastos con otras entidades, como minicélulas, células, lisosomas u otros cuerpos que pueden unirse a los lípidos de membrana (Fraley, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1859-1863, 1982).

El vector también puede introducirse en las células vegetales mediante electroporación (Fromm et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:5824, 1985). En esta técnica, protoplastos vegetales se electroporan en presencia de plásmidos que contienen la construcción del gen. Unos impulsos eléctricos de alta potencia de campo permeabilizan las biomembranas de forma reversible, lo que permite la introducción de los plásmidos. Los protoplastos vegetales electroporados reconstituyen la pared celular, se dividen y forman callos vegetales.

Todas las plantas a partir de las que pueden aislarse y cultivarse protoplastos para producir plantas regeneradas completas pueden transformarse de modo que se recuperen plantas completas que contengan el gen transferido. Se sabe que prácticamente todas las plantas pueden ser regeneradas a partir de tejidos o células cultivadas e incluyen, pero no se limitan a las principales especies de caña de azúcar, remolacha azucarera, algodón, fruta y otros árboles, leguminosas y hortalizas. Algunas plantas adecuadas incluyen, por ejemplo, especies de los géneros *Fragaria*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Vigna*, *Citrus*, *Linum*, *Geranium*, *Manihot*, *Daucus*, *Anabidopsis*, *Brassica*, *Raphanus*, *Sinapis*, *Atropa*, *Capsicum*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Lycopersion*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Petunia*, *Digitalis*, *Majorana*, *Cichorium*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Bromus*, *Asparagus*, *Antirrhinum*, *Hererocallis*, *Nemesia*, *Pelargonium*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Ranunculus*, *Senecio*, *Salpiglossis*, *Cucumis*, *Browaalia*, *Glycine*, *Lolium*, *Zea*, *Triticum*, *Sorghum* y *Datura*.

Los medios para la regeneración varían de una especie de planta a otra, pero en general se proporciona en primer lugar una suspensión de los protoplastos transformados que contienen copias del gen heterólogo. Se forma tejido de callo y pueden inducirse brotes a partir del callo y posteriormente enraizarse. Como alternativa, la formación de embriones puede inducirse a partir de la suspensión de protoplastos. Estos embriones germinan como embriones naturales para formar plantas. El medio de cultivo en general contiene diversos aminoácidos y hormonas, tales como auxina y citoquininas. También resulta ventajoso añadir ácido glutámico y prolina al medio, en especial para especies tales como el maíz y la alfalfa. Normalmente, los brotes y las raíces se desarrollan de modo simultáneo. Una regeneración eficaz dependerá del medio, del genotipo y de la historia del cultivo. Si estas tres variables se controlan, entonces la regeneración es totalmente reproducible y repetible.

En algunos sistemas de cultivo de células vegetales, la proteína de la invención deseada puede excretarse o como



alternativa, la proteína puede ser extraída de la planta completa. Donde la proteína de la invención deseada se segrega hacia el medio, esta puede recogerse. Como alternativa, los embriones y mitades de semillas sin embriones u otro tejido vegetal pueden romperse de modo mecánico para liberar cualquier proteína segregada entre las células y los tejidos. La mezcla puede suspenderse en una disolución tampón para extraer las proteínas solubles. Después se emplearán procedimientos convencionales de aislamiento y purificación de proteínas para purificar la proteína recombinante. Los parámetros de tiempo, temperatura, pH, oxígeno y volumen se ajustarán por medio de procedimientos convencionales para optimizar la expresión y la recuperación de la proteína heteróloga.

#### iv. Sistemas bacterianos

Las técnicas de expresión bacterianas se conocen en la técnica. Un promotor bacteriano es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse a la ADN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción secuencia abajo (3') de una secuencia codificadora (por ejemplo, un gen estructural) en ARNm. Un promotor presentará una región de inicio de la transcripción, que normalmente está colocada proximal al extremo 5' de la secuencia codificadora. La región de inicio de la transcripción habitualmente incluye un sitio de unión a la ARN polimerasa y un sitio de inicio de la transcripción. Un promotor bacteriano también puede tener un segundo dominio denominado operador, que puede solaparse con un sitio de unión a ARN polimerasa adyacente en el que comienza la síntesis de ARN. El operador permite la transcripción regulada negativa (inducible), puesto que una proteína represora del gen puede unirse al operador y así, inhibir la transcripción de un gen específico. La expresión constitutiva puede producirse en ausencia de elementos reguladores negativos, tales como el operador. Además, puede lograrse una regulación positiva mediante una secuencia de unión a la proteína activadora del gen que, si está presente, habitualmente se encuentra proximal (5') a la secuencia de unión a ARN polimerasa. Un ejemplo de una proteína activadora del 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 tanto, la expresión regulada puede ser positiva o negativa y con ello potencia o reduce la transcripción.

Las secuencias que codifican enzimas de la vía metabólica proporcionan secuencias de promotores particularmente útiles. Los ejemplos incluyen secuencias de promotores derivadas de enzimas que metabolizan azúcares, tales como galactosas, lactosa (*lac*) [Chang et al. (1977), Nature, 198:1056] y maltosa. Otros ejemplos incluyen secuencias de promotores 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 EEUU 4.738.921; documentos EP-A-0036776 y EP-A-0121775]. El sistema de promotor de g-lactamasa (*bla*) [Weissmann (1981), "The cloning of interferon and other mistakes", en Interferon 3 (ed. I. Gresser)] y los sistemas de promotores del bacteriófago lambda PL [Shimatake et al. (1981), Nature, 292:128] y T5 [patente de EEUU 4.689.406] también proporcionan secuencias de promotores útiles.

Además, los promotores sintéticos que no aparecen en la naturaleza también actúan como promotores bacterianos. Por ejemplo, las secuencias de activación de la transcripción de un promotor bacteriano o de bacteriófago pueden unirse con las secuencias de operón de otro promotor bacteriano o de bacteriófago, creando un promotor híbrido sintético [patente de EEUU 4.551.433]. Por ejemplo, el promotor *tac* es un promotor *trp-lac* híbrido formado por las secuencias del promotor *trp* y del operón *lac*, que está 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 naturales de origen no bacteriano que tengan la capacidad de unirse a la ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción. Un promotor natural de origen no bacteriano también puede acoplarse con una ARN polimerasa compatible para producir unos altos niveles de expresión de algunos genes en procariontes. El sistema de promotor/ARN polimerasa del bacteriófago T7 es un ejemplo de un sistema de 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 estar formado por un promotor de bacteriófago y una región de operador de *E. coli* (documento EPO-A-0 267 851).

Además de una secuencia de promotor en funcionamiento, un sitio de unión a ribosomas eficaz también resulta útil para la expresión de genes extraños en procariontes. En *E. coli*, el sitio de unión a ribosomas se denomina la secuencia de Shine-Dalgarno (SD) e incluye un codón de iniciación (ATG) y una secuencia con una longitud de 3-9 nucleótidos localizada 3-11 nucleótidos secuencia arriba del codón de iniciación [Shine et al. (1975), Nature, 254:34]. Se cree que la secuencia SD estimula la unión del ARNm al ribosoma mediante un apareamiento de bases entre la secuencia SD y el extremo 3' del 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 un sitio de unión a ribosomas débil [Sambrook et al. (1989), "Expression of cloned genes in *Escherichia coli*", en Molecular Cloning: A Laboratory Manual].

Una molécula de ADN puede expresarse de intracelularmente. Una secuencia de promotor puede unirse

directamente a la molécula de ADN, en cuyo caso el primer aminoácido en el N-terminal siempre será una metionina, que se codifica por el codón de iniciación ATG. Si se desea, la metionina en el N-terminal puede escindirse de la proteína mediante una incubación *in vitro* con bromuro de cianógeno, o mediante una incubación *in vivo* o *in vitro* con una metionina N-terminal peptidasa bacteriana (documento EPO-A 0 219 237).

5 Las proteínas de fusión proporcionan una alternativa a la expresión directa. Habitualmente, una secuencia de ADN que codifica la porción N-terminal de una proteína bacteriana endógena, u otra proteína estable, se une al extremo 5' de las secuencias codificadoras heterólogas. Tras la expresión, esta construcción proporcionará una fusión de las dos secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, el gen celular del bacteriófago lambda puede unirse al extremo 5'-terminal de un gen extraño y expresarse en bacterias. La proteína de fusión resultante preferiblemente conserva un sitio para una enzima procesadora (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 zona de unión de las dos secuencias de aminoácidos puede o no codificar un sitio escindible. Otro ejemplo es una proteína de fusión de ubiquitina. Esta proteína de fusión se fabrica con la región de ubiquitina que preferiblemente conserva un sitio para una enzima procesadora (por ejemplo, proteasa procesadora específica de ubiquitina) para escindir la ubiquitina de la proteína extraña. A través de este procedimiento, la proteína extraña nativa puede aislarse [Miller et al. (1989), *Bio/Technology*, 7:698].

20 Como alternativa, las proteínas extrañas también pueden ser segregadas de la célula creando moléculas de ADN quiméricas que codifican una proteína de fusión formada por un fragmento de una secuencia de péptido señal que proporciona la secreción de la proteína extraña en bacterias [patente de EEUU 4.336.336]. El fragmento de la secuencia señal habitualmente codifica un péptido señal formado por aminoácidos hidrófobos que dirigen la secreción de la proteína desde la célula. La proteína se segrega hacia el medio de crecimiento (bacterias gram-positivas) o hacia el espacio periplásmico, localizado entre la membrana externa e interna de la célula (bacterias gram-negativas). Preferiblemente, existen sitios de procesamiento que pueden escindirse bien *in vivo* o bien *in vitro* codificados entre el fragmento del péptido señal y el gen extraño.

30 El ADN que codifica las secuencias señal adecuadas puede derivarse de genes para proteínas bacterianas segregadas, tales como el gen de la proteína de la membrana externa de *E. coli* (*ompA*) [Masui et al. (1983), en: *Experimental Manipulation of Gene Expression*; Ghayeb 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 otro ejemplo, puede emplearse la secuencia señal del gen de alfa-amilasa de diversas cepas *Bacillus* para segregar proteínas heterólogas de *B. subtilis* [Palva et al. (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:5582; documento EP-A-0 244 042].

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

45 Habitualmente, los componentes descritos anteriormente, que comprenden un promotor, una secuencia señal (si se desea), una secuencia codificadora de interés y una secuencia de terminación de la transcripción, se juntan en construcciones de expresión. Las construcciones de expresión a menudo se mantienen en un replicón, tal como un elemento extracromosómico (por ejemplo, plásmidos) capaz de un mantenimiento estable en un huésped, tal como una bacteria. El replicón tendrá un sistema de replicación, lo que permite que se mantenga en un huésped procarionota para la expresión o para la clonación y la amplificación. Además, un replicón puede ser un plásmido bien de alto número de copias o bien de bajo número de copias. Un plásmido de alto número de copias en general tendrá un número de copias que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 y habitualmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 150. Un huésped que contiene un plásmido de alto número de copias preferiblemente contendrá al menos aproximadamente 10 y más preferiblemente al menos aproximadamente 20 plásmidos. Tanto un vector de alto como un vector de bajo número de copias puede seleccionarse, dependiendo del efecto del vector y la proteína extraña sobre el huésped.

55 Como alternativa, las construcciones de expresión pueden integrarse en el genoma bacteriano con un vector de integración. Los vectores de integración habitualmente contienen al menos una secuencia homóloga con el cromosoma bacteriano que permite que el vector se integre. Las integraciones parecen ser el resultado de recombinaciones entre ADN homólogo en el vector y el cromosoma bacteriano. Por ejemplo, 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 formados por secuencias de bacteriófagos o transposones.

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

Como alternativa, algunos de los componentes descritos anteriormente pueden juntarse en vectores de transformación. Los vectores de transformación habitualmente están formados por un marcador seleccionable que bien se mantiene en un replicón o bien se desarrolla en un vector de integración, tal como se describió 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, entre otras, para las siguientes bacterias: *Bacillus subtilis* [Palva et al. (1982), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:5582; documentos EP-A-0 036 259 y EPA-0 063 953; documento WO 84/04541], *Escherichia coli* [Shimatake 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 EEUU 4.745.056].

Los procedimientos para introducir ADN exógeno en huéspedes bacterianos se conocen bien en la técnica y habitualmente incluyen la transformación de bacterias tratadas con CaCl<sub>2</sub> u otros agentes, tales como cationes divalentes y DMSO. El ADN también puede introducirse en células bacterianas mediante electroporación. Los procedimientos de transformación habitualmente varían con las especies bacterianas a transformarse. Véanse, 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; documento WO 84/04541, para *Bacillus*], [Miller et al. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci., 85:856; Wang et al. (1990), J. Bacteriol., 172:949, para *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 y S. Nicosia); Mandel et al. (1970), J. Mol. Biol., 53:159; Taketo (1988), Biochim. Biophys. Acta, 949:318, para *Escherichia*], [Chassy et al. (1987), FEMS Microbiol. Lett., 44:173, para *Lactobacillus*], [Fiedler et al. (1988), Anal. Biochem, 170:38, para *Pseudomonas*], [Augustin et al. (1990), FEMS Microbiol. Lett., 66:203, para *Staphylococcus*], [Barany et al. (1980), J. Bacteriol., 144:698; Harlander (1987), "Transformation of *Streptococcus lactis* by electroporation", en: Streptococcal Genetics (ed. J. Ferretti y 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, para *Streptococcus*].

#### v. Expresión en levaduras

Los sistemas de expresión de levaduras también son conocidos para un experto en la técnica. Un promotor de levadura es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa de levadura e iniciar la transcripción de una secuencia abajó (3') de una secuencia codificadora (por ejemplo, un gen estructural) para producir ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción que habitualmente está colocada proximal al extremo 5' de la secuencia codificadora. Esta región de inicio de la transcripción habitualmente incluye un sitio de unión a la ARN polimerasa (la "caja TATA") y un sitio de inicio de la transcripción. Un promotor de levadura también puede incluir un segundo dominio denominado secuencia activadora de secuencia arriba (UAS) que, si está presente, habitualmente se encuentra distal con respecto al gen estructural. La UAS permite una expresión regulada (inducible). La expresión constitutiva aparece en ausencia de una UAS. La expresión regulada puede ser positiva o negativa, potenciando o reduciendo con ello la transcripción.

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

- Además, los promotores sintéticos que no aparecen en la naturaleza también actúan como promotores de levaduras. Por ejemplo, las secuencias UAS de un promotor de levadura pueden unirse a la región de activación de la transcripción de otro promotor de levadura, creando un promotor híbrido sintético. Los ejemplos de estos promotores híbridos incluyen la secuencia reguladora de ADH unida a la región de activación de la transcripción de GAP (patentes de EEUU n.ºs 4.876.197 y 4.880.734). Otros ejemplos de promotores híbridos incluyen promotores que consisten en las secuencias reguladoras de los genes *ADH2*, *GAL4*, *GAL10*, o *PHO5*, combinadas con la región de activación de la transcripción de un gen de una enzima glucolítica, tal como GAP o PyK (documento EP-A-0 164 556). Además, un promotor de levadura puede incluir promotores que aparecen en la naturaleza de origen no de levadura que tengan la capacidad de unirse a la ARN polimerasa de levadura e iniciar la transcripción. Los ejemplos de estos promotores incluyen, entre otros, Cohen et al. (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:1078; Henikoff et al. (1981), Nature, 283:835; Hollenberg 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 y A. Puhler); Mercerau-Puigalon et al. (1980), Gene, 11:163; Panthier et al. (1980), Curr. Genet. 2:109.
- Una molécula de ADN puede expresarse de modo intracelular en levaduras. Una secuencia de promotor puede estar unida directamente con la molécula de ADN, en cuyo caso el primer aminoácido en el N-terminal de la proteína recombinante siempre será una metionina, que se codifica por el codón de iniciación ATG. Si se desea, la metionina en el N-terminal puede escindirse de la proteína mediante una incubación *in vitro* con bromuro de cianógeno.
- Las proteínas de fusión proporcionan una alternativa para los sistemas de expresión de levaduras, así como en sistemas de expresión de mamífero, de baculovirus y bacterianos. Habitualmente, una secuencia de ADN que codifica la porción N-terminal de una proteína de levadura endógena, u otra proteína estable, se fusiona al extremo 5' de las secuencias codificadoras heterólogas. Después de la expresión, esta construcción proporcionará una fusión de las dos secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, la superóxido dismutasa (SOD) de levadura o humana puede unirse al 5' terminal de un gen extraño y expresarse en levaduras. La secuencia de ADN en la zona de unión de las dos secuencias de aminoácidos puede o no codificar un sitio escindible. Véase, por ejemplo, el documento EP-A-0 196 056. Otro ejemplo es una proteína de fusión de ubiquitina. Una proteína de fusión tal se fabrica con la región de ubiquitina que preferiblemente conserva un sitio para una enzima procesadora (por ejemplo, proteasa procesadora específica de ubiquitina) para escindir la ubiquitina de la proteína extraña. A través de este procedimiento, la proteína extraña nativa puede aislarse (por ejemplo, documento WO88/024066).
- Como alternativa, también pueden segregarse proteínas extrañas desde la célula hacia el medio de crecimiento creando moléculas de ADN quiméricas que codifican una proteína de fusión formada por un fragmento de una secuencia líder que proporciona la secreción de la proteína extraña en levaduras. Preferiblemente, existen sitios de procesamiento codificados entre el fragmento líder y el gen extraño que pueden escindirse *in vivo* o *in vitro*. El fragmento de la secuencia líder normalmente codifica un péptido señal formado por aminoácidos hidrófobos que dirige la secreción de la proteína desde la célula.
- El ADN que codifica las secuencias señal adecuadas puede derivarse de genes para las proteínas de levadura segregadas, 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 EEUU 4.588.684). Como alternativa, existen líderes con origen no de levadura, tales como un líder de interferón, que también proporcionan la secreción en levaduras (documento EP-A-0 060057).
- Una clase preferida de líderes de la secreción son los que emplean un fragmento del gen del factor alfa de levadura, que contiene una secuencia señal "pre" y una región "pro". Los tipos de fragmentos de factor alfa que pueden emplearse incluyen el líder del factor alfa pre-pro de longitud completa (aproximadamente 83 restos aminoácidos), así como los líderes del factor alfa truncados (habitualmente de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 restos aminoácidos) (patentes de EEUU 4.546.083 y 4.870.008; documento EP-A-0 324 274). Otros líderes que emplean un fragmento líder de factor alfa que proporciona la secreción incluyen los líderes del factor alfa híbridos formados con una presecuencia de una primera levadura, pero con una región pro de un segundo factor alfa de levadura (por ejemplo, véase el documento WO 89/02463).
- Habitualmente, las secuencias de terminación de la transcripción reconocidas por levaduras son regiones reguladoras localizadas 3' con respecto al codón de finalización de la traducción y por tanto, junto con el promotor, flanquean a la secuencia codificadora. Estas secuencias dirigen la transcripción de un ARNm que puede ser traducido en el polipéptido codificado por el ADN. Los ejemplos de una secuencia de terminación de la transcripción y otras secuencias de terminación reconocidas por levaduras, son las que codifican enzimas glucolíticas.
- Habitualmente, los componentes descritos anteriormente, que comprenden un promotor, un líder (si se desea), una secuencia codificadora de interés y una secuencia de terminación de la transcripción, se juntan en construcciones de expresión. Las construcciones de expresión a menudo se mantienen en un replicón, tal como un elemento

extracromosómico (por ejemplo, un plásmido) capaz de un mantenimiento estable en un huésped, tal como una levadura o una bacteria. El replicón puede tener dos sistemas de replicación, lo que permite que se mantenga, por ejemplo, en una levadura para la expresión y en un huésped procariota para la clonación y la amplificación. Los ejemplos de dichos vectores lanzadera de levaduras-bacterias incluyen YEp24 [Botstein et al. (1979), *Gene*, 8:17-24], pCII [Brake et al. (1984), *PNAS USA*, 81:4642-4646] e YRp17 [Stinchcomb et al. (1982), *J. Mol. Biol.*, 158:157]. Además, un replicón puede ser un plásmido de alto número de copias o de bajo número de copias. Un plásmido de alto número de copias en general tendrá un número de copias que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 y habitualmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 150. Un huésped que contiene un plásmido de alto número de copias preferiblemente contendrá al menos aproximadamente 10 y más preferiblemente al menos aproximadamente 20 plásmidos. Puede seleccionarse introducir un vector de alto o bajo número de copias, dependiendo del efecto del vector y la proteína extraña sobre el huésped. Véase, por ejemplo, Brake et al., *supra*.

Como alternativa, las construcciones de expresión pueden integrarse en el genoma de levadura con un vector de integración. Los vectores de integración habitualmente contienen al menos una secuencia homóloga con el cromosoma de levadura que permite que el vector se integre y preferiblemente contienen dos secuencias homólogas que flanquean a la construcción de expresión.

Las integraciones parecen ser el resultado de recombinaciones entre ADN homólogo en el vector y el cromosoma de levadura [Orr-Weaver et al. (1983), *Methods in Enzymol.*, 101:228-245]. Un vector de integración puede dirigirse a un locus específico en levaduras seleccionando la secuencia homóloga apropiada para su inclusión en el vector. Véase Orr-Weaver *et al.*, *supra*. Pueden integrarse una o más construcciones de expresión, lo que probablemente afecte a los niveles de proteína recombinante producida [Rine et al. (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:6750]. Las secuencias cromosómicas incluidas en el vector pueden aparecer como un único segmento en el vector, lo que provoca la integración del vector entero, o como dos segmentos homólogos con segmentos adyacentes en el cromosoma que flanquean a la construcción de expresión en el vector, lo que puede provocar la integración estable solo de la construcción de expresión.

Habitualmente, las construcciones de expresión extracromosómica y de integración pueden contener marcadores seleccionables para permitir la selección de cepas de levadura que se han transformado. Los marcadores seleccionables pueden incluir genes biosintéticos que pueden ser expresados 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 la tunicamicina y G418, respectivamente. Además, un marcador seleccionable adecuado también puede proporcionar a la levadura la capacidad de crecer en presencia de compuestos tóxicos, tales como un metal. Por ejemplo, la presencia de *CUP1* permite crecer a las levaduras en presencia de iones de cobre [Butt et al. (1987), *Microbiol. Rev.*, 51:351].

Como alternativa, algunos de los componentes descritos anteriormente pueden juntarse en vectores de transformación. Los vectores de transformación habitualmente están formados por un marcador seleccionable que bien se mantiene en un replicón o bien se desarrolla en un vector de integración, tal como se describió anteriormente.

Se han desarrollado vectores de expresión y transformación, tanto replicones extracromosómicos como vectores de integración, para la transformación en muchas levaduras. Por ejemplo, se han desarrollado vectores de expresión, entre otras, para 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 EEUU n.ºs: 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 y Nurse (1981), *Nature*, 300:706] y *Yarrowia lipolytica* [Davidow, et al. (1985), *Curr. Genet.*, 10:380471; Gaillardin, et al. (1985), *Curr. Genet.*, 10:49].

Los procedimientos para introducir ADN exógeno en huéspedes de levadura son muy conocidos en la técnica y habitualmente incluyen la transformación de esferoplastos o de células de levadura intactas tratadas con cationes de álcalis. Los procedimientos de transformación habitualmente varían con la especie de levadura que se va a transformar. Véase, por ejemplo, [Kurtz et al. (1986), *Mol. Cell. Biol.*, 6:142; Kunze et al. (1985), *J. Basic Microbiol.*, 25:141, para *Candida*]; [Gleeson et al. (1986), *J. Gen. Microbiol.*, 132:3459; Roggenkamp et al. (1986), *Mol. Gen. Genet.*, 202:302, para *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, para *Kluyveromyces*]; [Cregg et al. (1985), *Mol. Cell. Biol.*, 5:3376; Kunze et al. (1985), *J. Basic Microbiol.*, 25:141; patentes de EEUU n.ºs: 4.837.148 y 4.929.555, para *Pichia*]; [Hinnen et al. (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:1929; Ito et al. (1983), *J.*

Bacteriol., 153:163, para *Saccharomyces*]; [Beach y Nurse (1981), Nature, 300:706, para *Schizosaccharomyces*]; [Davidow et al. (1985), Curr. Genet., 10:39; Gaillardin et al. (1985), Curr. Genet., 10:49, para *Yarrowia*].

Anticuerpos

5 Tal como se emplea en la presente, el término “anticuerpo” se refiere a un polipéptido o un grupo de polipéptidos compuestos por al menos un sitio de combinación de anticuerpos. Un “sitio de combinación de anticuerpo” es un espacio de unión tridimensional con una forma en su superficie interna y una distribución de cargas complementarias con las características de un epitopo de un antígeno, lo que permite la unión del anticuerpo con el antígeno. Un “anticuerpo” incluye, por ejemplo, anticuerpos de vertebrados, anticuerpos híbridos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos alterados, anticuerpos univalentes, proteínas Fab y anticuerpos de un único dominio.

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

15 Los anticuerpos contra las proteínas de la invención, tanto policlonales como monoclonales, pueden prepararse por procedimientos convencionales. En general, en primer lugar la proteína se emplea para inmunizar a un animal adecuado, preferiblemente un ratón, rata, conejo o cabra. Se prefiere a los conejos y las cabras para la preparación de sueros policlonales debido al volumen de suero que se puede obtener y a la disponibilidad de anticuerpos anti-conejo y anti-cabra marcados. La inmunización en general se realiza mezclando o emulsionando la proteína en disolución salina, preferiblemente en un adyuvante tal como adyuvante completo de Freund e inyectando la mezcla o la emulsión por vía parenteral (en general por vía subcutánea o intramuscular). Una dosis de 50-200 g/inyección generalmente es suficiente. La inmunización en general se refuerza 2-6 semanas después con una o más inyecciones de la proteína en disolución salina, empleando preferiblemente adyuvante incompleto de Freund. Como alternativa se pueden generar anticuerpos mediante una inmunización *in vitro* empleando procedimientos conocidos en la técnica que, para los objetivos de la esta invención, se consideran equivalentes a una inmunización *in vivo*. El antisuero policlonal se obtiene sangrando el animal inmunizado hacia un recipiente de vidrio o plástico, incubando la sangre a 25 °C durante una hora, seguido de una incubación a 4 °C durante 2-18 horas. El suero se recupera mediante centrifugación (por ejemplo, 1.000 g durante 10 minutos). Pueden obtenerse aproximadamente 20-50 ml por sangrado en conejos.

30 Los anticuerpos monoclonales se preparan empleando el procedimiento convencional de Kohler y Milstein [Nature (1975), 256:495-96], o una de sus modificaciones. Generalmente, un ratón o una rata se inmuniza como se describió anteriormente. Sin embargo, en lugar de sangrar al animal para extraer el suero, se retira el bazo (y opcionalmente varios nódulos linfáticos grandes) y se disocia en células individuales. Si se desea, las células del bazo pueden seleccionarse (después de la eliminación de las células no específicamente adherentes) aplicando una suspensión de células a una placa o pocillo revestido con el antígeno de la proteína. Las células B que expresan una inmunoglobulina unida a la membrana que es específica para el antígeno se unen a la placa y no se eliminan por aclarado con el resto de la suspensión. Las células B resultantes, o todas las células del bazo disociadas, después se inducen para que se fusionen con células de mieloma para formar hibridomas y se cultivan en un medio selectivo (por ejemplo, medio de hipoxantina, aminopterina, timidina, “HAT”). Los hibridomas resultantes se cultivan mediante dilución limitante y se ensayan para la producción de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno inmunizante (y que no se unen a antígenos no relacionados). Los hibridomas que segregan los MAb seleccionados después se cultivan *in vitro* (por ejemplo, en botellas de cultivo de tejidos o reactores de fibras huecas), o *in vivo* (en fluido de ascitis en ratones).

45 Si se desea, el anticuerpo (policlonal o monoclonal) puede marcarse empleando técnicas convencionales. Los marcadores adecuados incluyen fluoróforos, cromóforos, átomos radioactivos (en particular <sup>32</sup>P y <sup>125</sup>I), reactivos densos a electrones, enzimas y ligandos que tienen compañeros de unión específica. Las enzimas generalmente se detectan por su actividad. Por ejemplo, la peroxidasa de rábano normalmente se detecta por su capacidad para convertir la 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en un pigmento azul que puede cuantificarse con un espectrofotómetro. El “compañero de unión específica” se refiere a una proteína capaz de unirse a una molécula de ligando con alta especificidad, como por ejemplo en el caso de un antígeno y un anticuerpo monoclonal específico para él. Otros compañeros de unión específica incluyen biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A y las numerosas parejas de receptor-ligando conocidas en la técnica. Debe entenderse que la anterior descripción no pretende categorizar los diversos marcadores en clases diferenciadas, puesto que el mismo marcador puede actuar de varios modos diferentes. Por ejemplo, <sup>125</sup>I puede actuar como marcador radiactivo o como reactivo denso a electrones. La HRP puede actuar como enzima o como antígeno para un MAb. Además, se pueden combinar diversos marcadores para un efecto deseado. Por ejemplo, los MAb y la avidina también necesitan marcadores en la práctica de esta invención: así, se puede marcar un MAb con biotina y detectar su presencia con avidina marcada con <sup>125</sup>I, o con un MAb anti-biotina marcado con HRP. Otras permutaciones y posibilidades serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica y se consideran como equivalentes dentro del ámbito de la

invención.

Composiciones farmacéuticas

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

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se emplea en el presente documento se refiere a una cantidad de un agente terapéutico para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o trastorno deseado, o para mostrar un efecto terapéutico o preventivo detectable. El efecto puede detectarse, por ejemplo, mediante marcadores químicos o niveles de antígeno. Los efectos terapéuticos también incluyen la reducción de los síntomas físicos, tales como una menor temperatura corporal. La cantidad eficaz precisa para un sujeto dependerá del tamaño y la salud del sujeto, de la naturaleza y el grado del trastorno y de los productos terapéuticos o de la combinación de productos terapéuticos seleccionados para la administración. Así, no resulta útil especificar una cantidad eficaz exacta por adelantado. Sin embargo, la cantidad eficaz para una situación concreta puede ser determinada mediante la experimentación habitual y está dentro del criterio del médico.

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

Una composición farmacéutica también puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo para la administración de un agente terapéutico, tal como anticuerpos o un polipéptido, genes y otros agentes terapéuticos. La expresión se refiere a cualquier vehículo farmacéutico que, en sí mismo, no induce la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición y que puede administrarse sin toxicidad indebida. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes que se metabolizan con lentitud, tales como proteínas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivas. Estos vehículos son muy conocidos por los expertos en la técnica.

En la presente pueden utilizarse sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como hidroclouros, hidrobromuros, fosfatos, sulfatos y similares; y sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Un análisis en profundidad de los excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

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

Procedimientos de administración

Tras haber sido formuladas, las composiciones pueden administrarse directamente al sujeto. Los sujetos que se van a tratar pueden ser animales; en particular, pueden tratarse seres humanos.

La administración directa de las composiciones en general se realizará mediante inyección, por vía bien subcutánea, bien intraperitoneal, bien intravenosa o bien intramuscular, o se administrará hacia el espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también pueden administrarse a una lesión. Otros modos de administración incluyen la administración oral y pulmonar, supositorios y aplicaciones transdérmicas o transcutáneas (véase, por ejemplo, el documento WO98/20734), agujas y pistolas de genes o hipopulverizados. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de una única dosis o un programa de múltiples dosis.

Vacunas

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

Tales vacunas comprenden uno o varios antígenos inmunizantes, uno o varios inmunógenos, uno o varios polipéptidos, una o varias proteínas o ácidos nucleicos, normalmente en combinación con "vehículos farmacéuticamente aceptables", que incluyen cualquier vehículo que por sí mismo no induce la producción de

anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados generalmente son macromoléculas grandes de metabolización lenta, tales como proteínas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados de lípidos (tales como gotitas de aceite o liposomas) y partículas de virus inactivos. Estos vehículos son muy conocidos por los expertos en la técnica. Además, estos vehículos pueden actuar como agentes inmunoestimulantes (“adyuvantes”). Además, el antígeno o inmunógeno puede estar conjugado con un toxoide bacteriano, tal como un toxoide de los patógenos de la difteria, tétanos, cólera, *H. pylori*, etc.

Los 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 emulsiones de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos, tales como péptidos de muramilo (véase a continuación) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como por ejemplo (a) MF59™ (documento WO 90/14837; capítulo 10 en Vaccine design: the subunit and adjuvant approach, eds. Powell y Newman, Plenum Press 1995), que contiene escualeno al 5%, Tween 80 al 0,5% y Span 85 al 0,5% (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE (véase a continuación), aunque no es necesario) formulado en partículas submicrónicas empleando un microfluidificador tal como el microfluidificador modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, que contiene escualeno al 10%, Tween 80 al 0,4%, polímero L121 bloqueado con Pluronic al 5% y thr-MDP (véase a continuación) bien microfluidificado en una emulsión submicrónica o bien agitado en vórtice para generar una emulsión con un tamaño de partícula mayor y (c) el sistema adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene escualeno al 2%, Tween 80 al 0,2% y uno o más componentes de la pared celular bacteriana procedentes del grupo que consiste en monofosforil-lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (Detox™); (3) adyuvantes de saponina, tales como Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) que pueden utilizarse, o pueden generarse partículas a partir de estos, tales 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), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; y (6) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para potenciar la eficacia de la composición. Se prefieren el alumbre y MF59™.

Tal como se mencionó anteriormente, los péptidos de muramilo incluyen, pero no se limitan a N-acetil-muramil-L-treoni-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-hidroxisforiloxi)etilamina (MTP-PE), etc.

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

Generalmente, las composiciones inmunógenas se preparan como inyectables, en forma bien de disoluciones o bien de suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para la disolución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas para un efecto adyuvante potenciado, tal como se analizó anteriormente al tratar los vehículos farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones inmunógenas empleadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de los polipéptidos antigénicos o inmunógenos, así como de cualquiera de los otros componentes mencionados anteriormente, según sea necesario. Por “cantidad inmunológicamente eficaz” se quiere decir que la administración de esta cantidad a un individuo, bien en una única dosis o bien como parte de una serie, resulta eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y de las condiciones físicas del individuo que se va a tratar, del grupo taxonómico del individuo que se va a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), de la capacidad del sistema inmunológico del individuo para sintetizar anticuerpos, del grado de protección deseado, de la formulación de la vacuna, de la evaluación de la situación médica por parte del médico encargado y de otros factores pertinentes. Se espera que la cantidad se encuentre en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos rutinarios.

Las composiciones inmunógenas se administran de modo convencional por vía parenteral, por ejemplo, mediante inyección bien subcutánea, bien intramuscular o bien transdérmica/transcutánea (por ejemplo, documento WO98/20734). Otras formulaciones adecuadas para otras vías de administración incluyen formulaciones orales y pulmonares, supositorios y aplicaciones transdérmicas. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de una única dosis o un programa de múltiples dosis. La vacuna puede administrarse junto con otros agentes inmunorreguladores.



Como alternativa a las vacunas con una base de proteínas, puede emplearse una vacunación de ADN [por ejemplo, Robinson y Torres (1997), *Seminars in Immunology*, 9:271-283; Donnelly et al. (1997), *Annu Rev Immunol.*, 15:617-648; véase a continuación].

Composiciones farmacéuticas de polipéptidos

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

A. Polipéptidos

Un ejemplo son los polipéptidos que incluyen, sin limitación: asioloorosomucoide (ASOR); transferrina; asialoglicoproteínas; anticuerpos; fragmentos de anticuerpos; ferritina; interleucinas; interferones; factor  
10 estimulante 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 células pluripotenciales y eritropoyetina. También pueden emplearse antígenos víricos, tales como proteínas de la envoltura. Además también pueden emplearse proteínas procedentes de otros organismos invasores, tales como el péptido de 17 aminoácidos procedente de la proteína del circumesporozoíto de *Plasmodium falciparum*, conocido como RIII.

15 B. Hormonas, vitaminas, etc.

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

C. Polialquilenos, polisacáridos, etc.

También puede incluirse un polialquilenglicol en los polinucleótidos/polipéptidos deseados. En una realización  
20 preferida, el polialquilenglicol es polietilenglicol. Además pueden incluirse mono-, di- o polisacáridos. En una realización preferida de este aspecto, el polisacárido es dextrano o DEAE-dextrano. Además, puede emplearse quitosano y poli(lactica-co-glicólido).

D. Lípidos y liposomas

El polinucleótido/polipéptido deseado también puede encapsularse en lípidos o empaquetarse en liposomas antes  
25 de la administración al sujeto o a las células derivadas de este.

La encapsulación con lípidos en general se logra empleando liposomas que son capaces de unir o atrapar y conservar de modo estable un ácido nucleico. La proporción de polinucleótido condensado a la preparación de lípidos puede variar, pero en general será de aproximadamente 1:1 (mg de ADN:micromoles de lípido), o más del lípido. Para un análisis del uso de liposomas como vehículos para la administración de ácidos nucleicos, véase,  
30 Hug y Sleight (1991), *Biochim. Brophys. Acta.*, 1097:1-17; Straubinger (1983), *Meth. Enzymol.*, 101:512-527.

Las preparaciones liposómicas para su uso en la presente invención incluyen preparaciones catiónicas (cargadas positivamente), aniónicas (cargadas negativamente) y neutras. Se ha demostrado que los liposomas catiónicos median en la administración intracelular de ADN plasmídico (Felgner (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:7413-7416); ARNm (Malone (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:6077-6081); y factores de la transcripción purificados (Debs (1990), *J. Biol. Chem.*, 265:10189-10192), en una forma funcional.  
35

Los liposomas catiónicos están disponibles con facilidad. Por ejemplo, los liposomas de N-[1-2,3-dioleiloxi]propil]-N,N,N-trietilamonio (DOTMA) están disponibles con la marca comercial Lipofectin, en GIBCO BRL, Grand Island, NY (véase, también Felgner, *supra*). Otros liposomas disponibles en el mercado incluyen Transfectace (DDAB/DOPE) y DOTAP/DOPE (Boerhinger). Pueden prepararse otros liposomas catiónicos a partir de materiales fácilmente disponibles empleando técnicas muy conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Szoka (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:4194-4198; el documento WO90/11092 para una descripción de la síntesis de liposomas de DOTAP (1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio)propano).  
40

De modo similar, están disponibles liposomas aniónicos y neutros, tales como en Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL), o pueden prepararse con facilidad empleando materiales fácilmente disponibles. Tales materiales incluyen fosfatidilcolina, colesterol, fosfatidiletanolamina, dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), entre otros. Estos materiales también pueden mezclarse con los materiales de partida DOTMA y DOTAP en proporciones apropiadas. Los procedimientos para fabricar liposomas empleando estos materiales son muy conocidos en la técnica.  
45

Los liposomas pueden comprender vesículas multilaminares (MLV), vesículas pequeñas unilaminares (SUV) o vesículas grandes unilaminares (LUV). Los diversos complejos de liposoma-ácido nucleico se preparan empleando  
50

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

#### E. Lipoproteínas

Además, pueden incluirse lipoproteínas con el polinucleótido/polipéptido que se va a administrar. Los ejemplos de lipoproteínas que se pueden utilizar incluyen quilomicrones, HDL, IDL, LDL y VLDL. También pueden emplearse mutantes, fragmentos o fusiones de estas proteínas. Además pueden emplearse modificaciones de lipoproteínas naturales, tales como LDL acetilado. Estas lipoproteínas pueden dirigir el transporte de los polinucleótidos a las células que expresan receptores de lipoproteínas. Preferiblemente, si se incluyen lipoproteínas con el polinucleótido que se va a administrar, no se incluyen otros ligandos de transporte dirigido en la composición.

Las lipoproteínas naturales comprenden un lípido y una porción de proteína. La porción de proteínas se conoce como apoproteína. En la actualidad, se han aislado e identificado las apoproteínas A, B, C, D y E. Al menos dos de estas contienen varias proteínas, denominadas con los números romanos AI, AII, AIV, CI, CII y CIII.

Una lipoproteína puede comprender más de una apoproteína. Por ejemplo, los quilomicrones naturales comprenden A, B C y E y a lo largo del tiempo estas lipoproteínas pierden A y adquieren las apoproteínas C y E. El VLDL comprende las apoproteínas A, B, C y E, el LDL comprende la apoproteína B; y el HDL comprende las apoproteínas A, C y E.

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

Las lipoproteínas contienen una diversidad de lípidos que incluyen triglicéridos, colesterol (libre y ésteres) y fosfolípidos. La composición de los lípidos varía en las lipoproteínas naturales. Por ejemplo, los quilomicrones están formados principalmente por triglicéridos. Una descripción más detallada del contenido en lípidos de las lipoproteínas naturales puede encontrarse, por ejemplo, en *Meth. Enzymol.*, 128 (1986). La composición de los lípidos se elige para ayudar a la conformación de la apoproteína para la actividad de unión al receptor. La composición de los lípidos también puede seleccionarse para facilitar la interacción hidrófoba y la asociación con la molécula de unión al polinucleótido.

Las lipoproteínas que se dan en la naturaleza pueden aislarse a partir del suero mediante ultracentrifugación, por ejemplo. Tales procedimientos se describen en *Meth. Enzymol.* (*supra*); Pitas (1980), *J. Biochem.*, 255:5454-5460; y Mahey (1979), *J. Clin. Invest.*, 64:743-750. Las lipoproteínas también pueden producirse por procedimientos *in vitro* o recombinantes mediante la expresión de los genes de apoproteínas 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 adquirirse en suministradores comerciales, tales como Biomedical Technologies, Inc., Stoughton, Massachusetts, EEUU. Puede encontrarse otra descripción de las lipoproteínas en Zuckermann et al., documento WO98/06437.

#### F. Agentes policatiónicos

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

Los agentes policatiónicos, generalmente, muestran una carga positiva neta al pH pertinente 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 *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Los agentes policatiónicos pueden emplearse para administrar ácidos nucleicos a un ser vivo por vía intramuscular, subcutánea, etc.

Lo siguiente son ejemplos de polipéptidos útiles como agentes policatiónicos: polilisina, poliarginina, poliornitina y protamina. Otros ejemplos incluyen histonas, protaminas, seroalbúmina humana, proteínas de unión al ADN, proteínas cromosómicas que no son histonas, proteínas de la envoltura de virus de ADN, tales como X174. Los factores de la transcripción también contienen dominios que se unen al ADN y por tanto pueden ser útiles como agentes condensantes de ácidos nucleicos. Brevemente, los factores transcripcionales, tales como C/CEBP, c-jun, c-fos, AP-1; AP-2, AP-3, CPF, Prow-1, Sp-1, Oct-1, Oct-2, CREP y TFIID contienen dominios básicos que se unen a secuencias de ADN.

Los agentes policatiónicos orgánicos incluyen espermina, espermidina y putrescina.

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

5 Los agentes policatiónicos sintéticos que son útiles incluyen, por ejemplo, DEAE-dextrano, polibreno, lipofectina y lipofectamina y son monómeros que forman complejos policatiónicos cuando se combinan con polinucleótidos/polipéptidos.

#### Ensayos de inmunodiagnóstico

10 Los antígenos meningocócicos de la invención pueden emplearse en inmunoensayos para detectar niveles de anticuerpos (o, a la inversa, los anticuerpos anti-meningocócicos pueden emplearse para detectar niveles de antígenos). Pueden desarrollarse inmunoensayos basados en antígenos recombinantes bien definidos, para sustituir a los procedimientos de diagnóstico invasivos. Pueden detectarse anticuerpos contra proteínas meningocócicas dentro de muestras biológicas, que incluyen, por ejemplo, muestras de sangre o suero. El diseño de los inmunoensayos está sometido a una amplia gama de variación y en la técnica se conoce una diversidad de estos. Los protocolos para el inmunoensayo pueden basarse, por ejemplo, en ensayos de competición, o de reacción directa, o de tipo "sandwich". Los protocolos también pueden usar, por ejemplo, soportes sólidos, o 15 pueden realizarse mediante inmunoprecipitación. La mayoría de los ensayos implican el uso de un anticuerpo o polipéptido marcado; las marcas pueden ser, por ejemplo, moléculas fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivas o de tinte. Los ensayos que amplifican las señales de la sonda también son conocidos; ejemplos de ellos son ensayos que utilizan biotina y avidina e inmunoensayos mediados y marcados con enzimas, tales como los ensayos ELISA.

20 Los kits adecuados para el inmunodiagnóstico y que contienen los reactivos apropiados se construyen envasando los materiales apropiados, que incluyen las composiciones de la invención, en recipientes adecuados, junto con el resto de los reactivos y materiales (por ejemplo, tampones adecuados, disoluciones salinas, etc.) requeridos para realizar el ensayo, así como un conjunto adecuado de instrucciones para el ensayo.

#### **Modos para realizar la invención**

25 La secuencia de proteína de 287 descrita en las solicitudes internacionales se ha sometido, entre otros, a un análisis por ordenador para predecir los fragmentos peptídicos antigénicos dentro de las proteínas de longitud completa. En este análisis se han usado tres algoritmos:

- **AMPHI**: se ha utilizado este programa para predecir los epitopos de células T [Gao et al. (1989), J. Immunol., 143:3007; Roberts et al. (1996), AIDS Res. Huni. Retrovir., 12:593; Quakyi et al. (1992), Scand. J. Immunol., supl. 30 11:9] y está disponible en el paquete Protean de DNASTAR, Inc. (1228 South Park Street, Madison, Wisconsin 53715, EE.UU.).

- **ÍNDICE ANTIGÉNICO**: según se describe en Jameson y Wolf (1988), The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants, CABIOS, 4:181:186.

35 - **HIDROFILICIDAD**: según se describe en Hopp y Woods (1981), Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences, PNAS, 78:3824-3828.

Los tres algoritmos a menudo identifican los mismos fragmentos. Estos fragmentos identificados varias veces son particularmente preferidos. Los algoritmos a menudo identifican fragmentos solapantes.

#### **Fragmentos de proteínas antigénicas preferidos**

40 Las siguientes secuencias de aminoácidos están identificadas por títulos que indican el número asignado a la fase de lectura abierta (ORF) particular, consistente con aquellos designados en las solicitudes internacionales. Los títulos son de la siguiente forma: [sin prefijo] [número] donde "sin prefijo" significa una secuencia de serotipo B de *N. meningitidis* y "número" significa el número asignado a esa fase de lectura abierta (ORF). Por ejemplo, "287" se refiere a una secuencia de aminoácidos de *N. meningitidis* B, número de ORF 287. Cada secuencia de aminoácidos está precedida por el número de posición del primer aminoácido y seguida por el número de posición 45 del último aminoácido.

#### Tabla 1

287

**Regiones AMPHI – AMPHI**

131-AlaThrAspAlaGlyGluSerSerGlnProAlaAsnGlnProAspMetAlaAsnAlaAlaAspGlyMet-153  
 164-AsnAlaGlyAsnThrAlaAlaGlnGlyAlaAsnGlnAlaGly-177  
 246-PheGluLysLeuSerAspAlaAspLysIleSerAsnTyrLys-259  
 291-ProThrSerPheAlaArgPheArgArgSerAlaArg-302

**Índice antigénico - Jameson-Wolf**

18-CysGlyGlyGlyGlyGlySerProAspValLysSerAlaAspThrLeuSerLysProAla-38  
 42-ValSerGluLysGluThrGluAlaLysGluAspAlaProGlnAlaGlySerGlnGlyGlnGlyAlaProSerAlaGlnGlySerGlnAspMet-72  
 74-AlaValSerGluGluAsnThrGlyAsnGlyGlyAlaValThrAlaAspAsnProLysAsnGluAspGluValAlaGlnAsnAspMetProGlnAsnAlaAlaGlyThrAspSerSerThrProAsnHisThrProAspProAsnMet-122  
 126-AsnMetGluAsnGlnAlaThrAspAlaGlyGluSerSerGlnProAlaAsnGlnProAspMetAlaAsnAlaAlaAspGlyMetGlnGlyAspAspProSerAlaGlyGlyGlnAsnAlaGlyAsnThrAlaAlaGlnGlyAlaAsnGlnAlaGlyAsnAsnGlnAlaAlaGlySerSerAspProIleProAlaSerAsnProAlaProAlaAsnGlyGlySerAsnPheGlyArgValAspLeuAlaAsn-209  
 223-ThrHisCysLysGlyAspSerCysSerGlyAsnAsnPheLeuAspGluGluValGlnLeuLysSerGluPheGluLysLeuSerAspAlaAspLysIleSerAsnTyrLysLysAspGlyLysAsnAspLysPhe-267  
 287-TyrLysProLysProThrSerPheAlaArgPheArgArgSerAlaArgSerArgArgSerLeuProAla-309  
 388-HisThrGluAsnGlyArgProTyrProThrArgGlyArgPheAlaAla-403  
 405-ValAspPheGlySerLysSerValAspGlyIleIleAspSerGlyAspAspLeuHisMetGlyThrGlnLysPheLysAlaAlaIleAspGlyAsnGlyPheLysGlyThrTrpThrGluAsnGlySerGlyAspValSerGly-452  
 454-PheTyrGlyProAlaGlyGluGluValAlaGlyLysTyrSerTyrArgProThrAspAlaGluLysGlyGlyPhe-478

**Regiones hidrófilas - Hopp-Woods**

22-GlyGlyGlySerProAspValLysSerAlaAspThrLeuSerLysProAla-38  
 42-ValSerGluLysGluThrGluAlaLysGluAspAlaProGln-55  
 86-ValThrAlaAspAsnProLysAsnGluAspGluValAlaGlnAsnAspMetProGln-104  
 127-MetGluAsnGlnAlaThrAspAlaGlyGluSerSerGlnProAlaAsnGlnProAspMetAlaAsnAlaAlaAspGlyMetGlnGlyAspAspProSerAlaGly-161  
 182-AlaGlySerSerAspProllePro-189  
 235-PheLeuAspGluGluValGlnLeuLysSerGluPheGluLysLeuSerAspAlaAspLysIleSerAsnTyrLysLysAspGlyLysAsnAspLysPhe-267  
 295-AlaArgPheArgArgserAlaArgserArgArgserLeuPro-308  
 390-GluAsnGlyArgProTyrProThrArgGlyArgPheAlaAla-403  
 405-ValAspPheGlySerLysSerValAspGlyIleIleAspSerGlyAspAspLeuHis-423  
 466-TyrSerTyrArgProThrAspAlaGluLysGlyGly-477

5

**Listado de secuencias**

<110> NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L

<120> Péptidos antigénicos de *Neisseria*

5 <130> P055439EP

<140> EP

<141> 30-10-2000

10 <150> US 60/162616

<151> 29-10-1999

<160> 53

15 <170> Seqwin99, versión 1.02

<210> 1

<211> 429

<212> PRT

20 <213> *Neisseria, gonorrhoeae*

<400> 1

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

ES 2 559 317 T3

Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Ile Pro Leu Ile Pro  
 245 250 255  
 Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu  
 260 265 270  
 Thr Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr  
 275 280 285  
 Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg  
 290 295 300  
 Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Val Gly Thr Ala Val  
 305 310 315 320  
 Tyr Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Met Glu Asn Gly Arg Pro Tyr  
 325 330 335  
 Pro Ser Gly Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser  
 340 345 350  
 Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln  
 355 360 365  
 Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr  
 370 375 380  
 Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr Gly Pro Ala Gly  
 385 390 395 400  
 Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys  
 405 410 415  
 Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Asp Arg Asp  
 420 425

<210> 2

<211> 488

5 <212> PRT

<213> *Neisseria meningitidis*

<400> 2

ES 2 559 317 T3

Met 1	Phe	Lys	Arg	Ser 5	Val	Ile	Ala	Met	Ala 10	Cys	Ile	Phe	Ala	Leu 15	Ser
Ala	Cys	Gly	Gly 20	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser 25	Pro	Asp	Val	Lys	Ser 30	Ala	Asp
Thr	Leu	Ser 35	Lys	Pro	Ala	Ala 40	Pro	Val	Val	Ser	Glu 45	Lys	Glu	Thr	Glu
Ala 50	Lys	Glu	Asp	Ala	Pro	Gln 55	Ala	Gly	Ser	Gln	Gly 60	Gln	Gly	Ala	Pro
Ser 65	Ala	Gln	Gly	Ser	Gln 70	Asp	Met	Ala	Ala	Val 75	Ser	Glu	Glu	Asn	Thr 80
Gly	Asn	Gly	Gly	Ala 85	Val	Thr	Ala	Asp	Asn 90	Pro	Lys	Asn	Glu	Asp 95	Glu
Val	Ala	Gln	Asn 100	Asp	Met	Pro	Gln	Asn 105	Ala	Ala	Gly	Thr	Asp 110	Ser	Ser
Thr	Pro	Asn 115	His	Thr	Pro	Asp	Pro 120	Asn	Met	Leu	Ala	Gly 125	Asn	Met	Glu
Asn 130	Gln	Ala	Thr	Asp	Ala	Gly 135	Glu	Ser	Ser	Gln	Pro 140	Ala	Asn	Gln	Pro



Asp Met Ala Asn Ala Ala Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala  
 145 150 155 160  
 Gly Gly Gln Asn Ala Gly Asn Thr Ala Ala Gln Gly Ala Asn Gln Ala  
 165 170 175  
 Gly Asn Asn Gln Ala Ala Gly Ser Ser Asp Pro Ile Pro Ala Ser Asn  
 180 185 190  
 Pro Ala Pro Ala Asn Gly Gly Ser Asn Phe Gly Arg Val Asp Leu Ala  
 195 200 205  
 Asn Gly Val Leu Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His  
 210 215 220  
 Cys Lys Gly Asp Ser Cys Ser Gly Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val  
 225 230 235 240  
 Gln Leu Lys Ser Glu Phe Glu Lys Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser  
 245 250 255  
 Asn Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Asn Asp Lys Phe Val Gly Leu Val Ala  
 260 265 270  
 Asp Ser Val Gln Met Lys Gly Ile Asn Gln Tyr Ile Ile Phe Tyr Lys  
 275 280 285  
 Pro Lys Pro Thr Ser Phe Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg  
 290 295 300  
 Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp  
 305 310 315 320  
 Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly  
 325 330 335  
 Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala  
 340 345 350  
 Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro  
 355 360 365  
 Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Ala Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val  
 370 375 380  
 Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Tyr Pro Thr Arg Gly Arg  
 385 390 395 400  
 Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile  
 405 410 415  
 Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala  
 420 425 430  
 Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Ser Gly  
 435 440 445  
 Asp Val Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly  
 450 455 460  
 Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val  
 465 470 475 480  
 Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp  
 485

<210> 3

<211> 497

<212> PRT

5 <213> *Neisseria meningitidis*

<400> 3

Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Val Ala Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp  
 20 25 30  
 Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Thr Glu Asp Val Gly Glu  
 35 40 45  
 Glu Val Leu Pro Lys Glu Lys Lys Asp Glu Glu Ala Val Ser Gly Ala  
 50 55 60  
 Pro Gln Ala Asp Thr Gln Asp Ala Thr Ala Gly Lys Gly Gly Gln Asp  
 65 70 75 80  
 Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr  
 85 90 95  
 Thr Asp Asn Pro Glu Asn Lys Asp Glu Gly Pro Gln Asn Asp Met Pro  
 100 105 110  
 Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Ser Thr Pro Asn His Thr Pro Ala  
 115 120 125  
 Pro Asn Met Pro Thr Arg Asp Met Gly Asn Gln Ala Pro Asp Ala Gly  
 130 135 140  
 Glu Ser Ala Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Ala Ala Asp  
 145 150 155 160  
 Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala Gly Glu Asn Ala Gly Asn Thr  
 165 170 175  
 Ala Asp Gln Ala Ala Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Val Gly Gly Ser  
 180 185 190  
 Gln Asn Pro Ala Ser Ser Thr Asn Pro Asn Ala Thr Asn Gly Gly Ser  
 195 200 205  
 Asp Phe Gly Arg Ile Asn Val Ala Asn Gly Ile Lys Leu Asp Ser Gly  
 210 215 220  
 Ser Glu Asn Val Thr Leu Thr His Cys Lys Asp Lys Val Cys Asp Arg  
 225 230 235 240  
 Asp Phe Leu Asp Glu Glu Ala Pro Pro Lys Ser Glu Phe Glu Lys Leu  
 245 250 255  
 Ser Asp Glu Glu Lys Ile Asn Lys Tyr Lys Lys Asp Glu Gln Arg Glu  
 260 265 270  
 Asn Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Arg Val Glu Lys Asn Gly Thr Asn  
 275 280 285  
 Lys Tyr Val Ile Ile Tyr Lys Asp Lys Ser Ala Ser Ser Ser Ala  
 290 295 300  
 Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met  
 305 310 315 320  
 Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu  
 325 330 335  
 Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly  
 340 345 350

Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Ser Gly Gly Ser  
 355 360 365  
 Tyr Ala Leu Ser Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala  
 370 375 380  
 Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Met Glu Asn  
 385 390 395 400  
 Gly Arg Pro Ser Pro Ser Gly Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe  
 405 410 415  
 Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His  
 420 425 430  
 Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Val Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys  
 435 440 445  
 Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr  
 450 455 460  
 Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr  
 465 470 475 480  
 Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln  
 485 490 495

Asp

<210> 4

<211> 425

5 <212> PRT

<213> *Neisseria meningitidis*

<400> 4

ES 2 559 317 T3

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

<210> 5

<211> 492

5 <212> PRT

<213> *Neisseria meningitidis*

<400> 5

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

Ile Phe Tyr Lys Pro Lys Pro Thr Ser Phe Ala Arg Phe Arg Arg Ser  
 290 295 300  
 Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val  
 305 310 315 320  
 Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr  
 325 330 335  
 Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu  
 340 345 350  
 Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val  
 355 360 365  
 Gln Gly Glu Pro Ser Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr  
 370 375 380  
 Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Ser Pro  
 385 390 395 400  
 Ser Arg Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val  
 405 410 415  
 Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Gly Leu His Met Gly Thr Gln Lys  
 420 425 430  
 Phe Lys Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu  
 435 440 445  
 Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu  
 450 455 460  
 Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly  
 465 470 475 480  
 Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp  
 485 490

<210> 6

<211> 488

5 <212> PRT

<213> *Neisseria meningitidis*

<400> 6

ES 2 559 317 T3

Met	Phe	Lys	Arg	Ser	Val	Ile	Ala	Met	Ala	Cys	Ile	Phe	Ala	Leu	Ser
1				5					10					15	
Ala	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Pro	Asp	Val	Lys	Ser	Ala	Asp
		20						25					30		
Thr	Leu	Ser	Lys	Pro	Ala	Ala	Pro	Val	Val	Ser	Glu	Lys	Glu	Thr	Glu
		35					40					45			
Ala	Lys	Glu	Asp	Ala	Pro	Gln	Ala	Gly	Ser	Gln	Gly	Gln	Gly	Ala	Pro
	50					55					60				
Ser	Ala	Gln	Gly	Ser	Gln	Asp	Met	Ala	Ala	Val	Ser	Glu	Glu	Asn	Thr
65					70					75				80	
Gly	Asn	Gly	Gly	Ala	Val	Thr	Ala	Asp	Asn	Pro	Lys	Asn	Glu	Asp	Glu
				85					90					95	
Val	Ala	Gln	Asn	Asp	Met	Pro	Gln	Asn	Ala	Ala	Gly	Thr	Asp	Ser	Ser
			100					105					110		
Thr	Pro	Asn	His	Thr	Pro	Asp	Pro	Asn	Met	Leu	Ala	Gly	Asn	Met	Glu
		115					120					125			



Asn Gln Ala Thr Asp Ala Gly Glu Ser Ser Gln Pro Ala Asn Gln Pro  
 130 135 140  
 Asp Met Ala Asn Ala Ala Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala  
 145 150 155 160  
 Gly Gly Gln Asn Ala Gly Asn Thr Ala Ala Gln Gly Ala Asn Gln Ala  
 165 170 175  
 Gly Asn Asn Gln Ala Ala Gly Ser Ser Asp Pro Ile Pro Ala Ser Asn  
 180 185 190  
 Pro Ala Pro Ala Asn Gly Gly Ser Asn Phe Gly Arg Val Asp Leu Ala  
 195 200 205  
 Asn Gly Val Leu Ile Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His  
 210 215 220  
 Cys Lys Gly Asp Ser Cys Ser Gly Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val  
 225 230 235 240  
 Gln Leu Lys Ser Glu Phe Glu Lys Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser  
 245 250 255  
 Asn Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Asn Asp Lys Phe Val Gly Leu Val Ala  
 260 265 270  
 Asp Ser Val Gln Met Lys Gly Ile Asn Gln Tyr Ile Ile Phe Tyr Lys  
 275 280 285  
 Pro Lys Pro Thr Ser Phe Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg  
 290 295 300  
 Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp  
 305 310 315 320  
 Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly  
 325 330 335  
 Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala  
 340 345 350  
 Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro  
 355 360 365  
 Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly Ala Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val  
 370 375 380  
 Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Tyr Pro Thr Arg Gly Arg  
 385 390 395 400  
 Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile  
 405 410 415  
 Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala  
 420 425 430  
 Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Ser Gly  
 435 440 445  
 Asp Val Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly  
 450 455 460  
 Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val  
 465 470 475 480  
 Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp  
 485

<210> 7

<211> 497

<212> PRT

5 <213> *Neisseria meningitidis*

<400> 7

Met Phe Lys Arg Ser Val Ile Ala Met Ala Cys Ile Val Ala Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp  
 20 25 30  
 Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro Val Val Thr Glu Asp Val Gly Glu  
 35 40 45  
 Glu Val Leu Pro Lys Glu Lys Lys Asp Glu Glu Ala Val Ser Gly Ala  
 50 55 60  
 Pro Gln Ala Asp Thr Gln Asp Ala Thr Ala Gly Lys Gly Gly Gln Asp  
 65 70 75 80  
 Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala Thr  
 85 90 95  
 Thr Asp Asn Pro Glu Asn Lys Asp Glu Gly Pro Gln Asn Asp Met Pro  
 100 105 110  
 Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Ser Thr Pro Asn His Thr Pro Ala  
 115 120 125  
 Pro Asn Met Pro Thr Arg Asp Met Gly Asn Gln Ala Pro Asp Ala Gly  
 130 135 140  
 Glu Ser Ala Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Ala Ala Asp  
 145 150 155 160  
 Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala Gly Glu Asn Ala Gly Asn Thr  
 165 170 175  
 Ala Asp Gln Ala Ala Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Val Gly Gly Ser  
 180 185 190  
 Gln Asn Pro Ala Ser Ser Thr Asn Pro Asn Ala Thr Asn Gly Gly Ser  
 195 200 205  
 Asp Phe Gly Arg Ile Asn Val Ala Asn Gly Ile Lys Leu Asp Ser Gly  
 210 215 220  
 Ser Glu Asn Val Thr Leu Thr His Cys Lys Asp Lys Val Cys Asp Arg  
 225 230 235 240  
 Asp Phe Leu Asp Glu Glu Ala Pro Pro Lys Ser Glu Phe Glu Lys Leu  
 245 250 255  
 Ser Asp Glu Glu Lys Ile Asn Lys Tyr Lys Lys Asp Glu Gln Arg Glu  
 260 265 270  
 Asn Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Arg Val Glu Lys Asn Gly Thr Asn  
 275 280 285  
 Lys Tyr Val Ile Ile Tyr Lys Asp Lys Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ala  
 290 295 300  
 Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met  
 305 310 315 320  
 Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu  
 325 330 335

Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly  
 340 345 350  
 Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Ser Gly Gly Ser  
 355 360 365  
 Tyr Ala Leu Ser Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala  
 370 375 380  
 Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Met Glu Asn  
 385 390 395 400  
 Gly Arg Pro Ser Pro Ser Gly Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe  
 405 410 415  
 Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His  
 420 425 430  
 Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Val Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys  
 435 440 445  
 Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr  
 450 455 460  
 Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr  
 465 470 475 480  
 Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln  
 485 490 495

Asp

<210> 8

<211> 429

5 <212> PRT

<213> *Neisseria meningitidis*

<400> 8

ES 2 559 317 T3

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

Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His Cys Lys Gly Asp Ser Cys  
 165 170 175  
 Asn Gly Asp Asn Leu Leu Asp Glu Glu Ala Pro Ser Lys Ser Glu Phe  
 180 185 190  
 Glu Lys Leu Ser Asp Glu Glu Lys Ile Lys Arg Tyr Lys Lys Asp Glu  
 195 200 205  
 Gln Arg Glu Asn Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Arg Val Lys Lys Asp  
 210 215 220  
 Gly Thr Asn Lys Tyr Ile Ile Phe Tyr Thr Asp Lys Pro Pro Thr Arg  
 225 230 235 240  
 Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Ile Pro Leu Ile Pro  
 245 250 255  
 Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu  
 260 265 270  
 Thr Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr  
 275 280 285  
 Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg  
 290 295 300  
 Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Val Gly Thr Ala Val  
 305 310 315 320  
 Tyr Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Met Glu Asn Gly Arg Pro Tyr  
 325 330 335  
 Pro Ser Gly Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser  
 340 345 350  
 Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln  
 355 360 365  
 Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr  
 370 375 380  
 Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser Gly Arg Phe Tyr Gly Pro Ala Gly  
 385 390 395 400  
 Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys  
 405 410 415  
 Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Asp Arg Asp  
 420 425

<210> 9

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

5 <400> 9

Lys Ser Ala Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala  
1 5 10

<210> 10

<211> 5

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

15

<400> 10

Gly Ser Gln Asp Met  
1 5

<210> 11

20 <211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Fragmento de proteína

<400> 11

Ala Thr Asp Ala Gly Glu Ser Ser Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met  
1 5 10 15  
Ala Asn Ala Ala Asp Gly Met  
20

<210> 12

<211> 14

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

10 <400> 12

Asn Ala Gly Asn Thr Ala Ala Gln Gly Ala Asn Gln Ala Gly  
1 5 10

<210> 13

<211> 14

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

20

<400> 13

Phe Glu Lys Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser Asn Tyr Lys  
1 5 10

<210> 14

25 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Fragmento de proteína

<400> 14



Pro Thr Ser Phe Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg  
1 5 10

<210> 15

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

10

<400> 15

Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser  
1 5

<210> 16

15 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Fragmento de proteína

<400> 16

Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr  
1 5

25 <210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 17

Val Ser Gly Lys Phe Tyr  
1 5

5

<210> 18

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 18

Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp Thr  
1 5 10 15  
Leu Ser Lys Pro Ala  
20

15

<210> 19

<211> 31

<212> PRT

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

25

<400> 19

Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu Ala Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala Gly  
1 5 10 15  
Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro Ser Ala Gln Gly Ser Gln Asp Met  
20 25 30

<210> 20

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 20

```

Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Val Thr Ala Asp
 1          5          10
Asn Pro Lys Asn Glu Asp Glu Val Ala Gln Asn Asp Met Pro Gln Asn
          20          25          30
Ala Ala Gly Thr Asp Ser Ser Thr Pro Asn His Thr Pro Asp Pro Asn
          35          40          45
Met
    
```

10

<210> 21

<211> 84

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 21

```

Asn Met Glu Asn Gln Ala Thr Asp Ala Gly Glu Ser Ser Gln Pro Ala
 1          5          10
Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Ala Ala Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp
          20          25          30
Pro Ser Ala Gly Gly Gln Asn Ala Gly Asn Thr Ala Ala Gln Gly Ala
          35          40          45
Asn Gln Ala Gly Asn Asn Gln Ala Ala Gly Ser Ser Asp Pro Ile Pro
          50          55          60
Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Asn Gly Gly Ser Asn Phe Gly Arg Val
 65          70          75          80
Asp Leu Ala Asn
    
```

20

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 22

Asp Gly Pro Ser Gln Asn  
1 5

10

<210> 23

<211> 45

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

20 <400> 23

Thr His Cys Lys Gly Asp Ser Cys Ser Gly Asn Asn Phe Leu Asp Glu  
1 5 10 15  
Glu Val Gln Leu Lys Ser Glu Phe Glu Lys Leu Ser Asp Ala Asp Lys  
20 25 30  
Ile Ser Asn Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Asn Asp Lys Phe  
35 40 45

<210> 24

<211> 23

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 24

Tyr Lys Pro Lys Pro Thr Ser Phe Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg  
1 5 10 15  
Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala  
20

5 <210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 25

Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala  
1 5

15

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 26

Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu  
1 5

25

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

5

<400> 27

Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr  
1 5 10

<210> 28

10 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Fragmento de proteína

<400> 28

Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met  
1 5 10

20 <210> 29

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 29

His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Tyr Pro Thr Arg Gly Arg Phe Ala Ala  
1 5 10 15

<210> 30

<211> 48

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

10 <400> 30

Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp  
1 5 10 15  
Asp Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp Gly Asn  
20 25 30  
Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Ser Gly Asp Val Ser Gly  
35 40 45

<210> 31

<211> 25

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

20

<400> 31

Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg  
1 5 10 15  
Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe  
20 25

<210> 32

25 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

5 <400> 32

Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp  
1 5

<210> 33

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

15

<400> 33

Gly Gly Gly Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp Thr Leu Ser Lys Pro  
1 5 10 15  
Ala

<210> 34

20 <211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Fragmento de proteína

<400> 34

Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu Ala Lys Glu Asp Ala Pro Gln  
1 5 10

30 <210> 35



<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 35

Gly Ser Gln Gly Gln Gly  
1 5

10

<210> 36

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 36

Gln Gly Ser Gln Asp  
1 5

20

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

30 <400> 37

Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr Gly  
1 5

<210> 38

<211> 19

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

10

<400> 38

Val Thr Ala Asp Asn Pro Lys Asn Glu Asp Glu Val Ala Gln Asn Asp  
1 5 10 15

Met Pro Gln

<210> 39

15 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Fragmento de proteína

<400> 39

Ala Gly Thr Asp Ser Ser Thr  
1 5

25 <210> 40

<211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 40

Met Glu Asn Gln Ala Thr Asp Ala Gly Glu Ser Ser Gln Pro Ala Asn  
1 5 10 15  
Gln Pro Asp Met Ala Asn Ala Ala Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro  
20 25 30  
Ser Ala Gly  
5 35

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

15 <400> 41

Ala Gly Ser Ser Asp Pro Ile Pro  
1 5

<210> 42

<211> 7

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

25

<400> 42

Cys Lys Gly Asp Ser Cys Ser  
1 5

<210> 43

<211> 33

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

10 <400> 43

**Phe Leu Asp Glu Glu Val Gln Leu Lys Ser Glu Phe Glu Lys Leu Ser**  
**1 5 10 15**  
**Asp Ala Asp Lys Ile Ser Asn Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Asn Asp Lys**  
**20 25 30**  
**Phe**

<210> 44

<211> 14

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

20

<400> 44

**Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro**  
**1 5 10**

<210> 45

25 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 45

5

Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala  
1 5

<210> 46

<211> 6

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

15 <400> 46

Gly Ala Glu Lys Leu Pro  
1 5

<210> 47

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

25

<400> 47

Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met  
1 5 10

<210> 48

30 <211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

5

<400> 48

Glu Asn Gly Arg Pro Tyr Pro Thr Arg Gly Arg Phe Ala Ala  
1 5 10

<210> 49

10 <211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Fragmento de proteína

<400> 49

Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp  
1 5 10 15  
Asp Leu His

20 <210> 50

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 50

Gln Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp  
1 5

30

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 51

10

Gly ser Gly Asp Val ser Gly  
1 5

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

20

<400> 52

Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly  
1 5

<210> 52

<211> 12

25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

30

<400> 53

Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly  
1 5 10



REIVINDICACIONES

1.- Una proteína que comprende uno o más fragmentos de la SEC ID N.º: 1202 del documento WO99/57280

(MFKRSVIAMACIFALSACGGGGGGSPDVKSADTLSPAAPV  
VSEKETEAKEDAPQAGSQGGGAPSAQGSQDMAAVSEENTGNGGAVTADNPKNE  
DEVAQNNDMPQNAAGTDSSTPNHTPDPNMLAGNMENQATDAGESSQPANQPDMA  
NAADGMQGGDDPSAGGQNAGNTAAQGANQAGNNQAAGSSDPIASNPAPANGGS  
NFGRVDLANGVVLIDGPSQNILTHCKGDSCSGNNFLDEEVQLKSEFEKLSADKIS  
NYKKDGGKNDKVFVGLVADSVQMKGINQYIIFYKPKPTSFARFRRSARSRRSLPAEM  
PLIPVNQADTLIVDGEAVSLTGHSNIFAPEGNRYRILTYGAEKLPGGSYALRVQGE  
PAKGEMLAGAAVYNGEVLHFHTENGRPYPTRGRFAAKVDFGSKSVDGIIDSGDDL  
HMGTQKFKAAIDGNGFKGTWTENSGSDVSGKFYGPAGEEVAGKYSYRPTDAEK  
GGFGVVFAGKKEQD),

en la que dicho(s) fragmento(s):

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

131-AlaThrAspAlaGlyGluSerSerGlnProAlaAsnGlnProAspMetAlaAsnAlaAlaAspGlyMet-153  
164-AsnAlaGlyAsnThrAlaAlaGlnGlyAlaAsnGlnAlaGly-177  
246-PheGluLysLeuSerAspAlaAspLysIleSerAsnTyrLys-259  
291-ProThrSerPheAlaArgPheArgArgSerAlaArg-302  
18-CysGlyGlyGlyGlyGlyGlySerProAspValLysSerAlaAspThrLeuSerLysProAla-38

42-ValSerGluLysGluThrGluAlaLysGluAspAlaProGlnAlaGlySerGlnGlyGlnGlyAlaProSerAla  
GlnGlySerGlnAspMet-72

74-AlaValSerGluGluAsnThrGlyAsnGlyGlyAlaValThrAlaAspAsnProLysAsnGluAspGluValAla  
GlnAsnAspMetProGlnAsnAlaAlaGlyThrAspSerSerThrProAsnHisThrProAspProAsnMet-122

## ES 2 559 317 T3

126-AsnMetGluAsnGlnAlaThrAspAlaGlyGluSerSerGlnProAlaAsnGlnProAspMetAlaAsnAlaAlaAspGlyMetGlnGlyAspAspProSerAlaGlyGlyGlnAsnAlaGlyAsnThrAlaAlaGlnGlyAlaAsnGlnAlaGlyAsnAsnGlnAlaAlaGlySerSerAspProIleProAlaSerAsnProAlaProAlaAsnGlyGlySerAsnPheGlyArgValAspLeuAlaAsn-209

223-ThrHisCysLysGlyAspSerCysSerGlyAsnAsnPheLeuAspGluGluValGlnLeuLysSerGluPheGluLysLeuSerAspAlaAspLysIleSerAsnTyrLysLysAspGlyLysAsnAspLysPhe-267

287-TyrLysProLysProThrSerPheAlaArgPheArgArgSerAlaArgSerArgArgSerLeuProAla-309 388-HisThrGluAsnGlyArgProTyrProThrArgGlyArgPheAlaAla-403

405-ValAspPheGlySerLysSerValAspGlyIleIleAspSerGlyAspAspLeuHisMetGlyThrGlnLysPheLysAlaAlaIleAspGlyAsnGlyPheLysGlyThrTrpThrGluAsnGlySerGlyAspValSerGly-452

454-PheTyrGlyProAlaGlyGluGluValAlaGlyLysTyrSerTyrArgProThrAspAlaGluLysGlyGlyPhe-478

22-GlyGlyGlySerProAspValLysSerAlaAspThrLeuSerLysProAla-38 42-ValSerGluLysGluThrGluAlaLysGluAspAlaProGln-55 86-ValThrAlaAspAsnProLysAsnGluAspGluValAlaGlnAsnAspMetProGln-104

127-MetGluAsnGlnAlaThrAspAlaGlyGluSerSerGlnProAlaAsnGlnProAspMetAlaAsnAlaAlaAspGlyMetGlnGlyAspAspProSerAlaGly-161

235-PheLeuAspGluGluValGlnLeuLysSerGluPheGluLysLeuSerAspAlaAspLysIleSerAsnTyrLysLysAspGlyLysAsnAspLysPhe-267

295-AlaArgPheArgArgSerAlaArgSerArgArgSerLeuPro-308  
390-GluAsnGlyArgProTyrProThrArgGlyArgPheAlaAla-403  
405-ValAspPheGlySerLysSerValAspGlyIleIleAspSerGlyAspAspLeuHis-423  
466-TyrSerTyrArgProThrAspAlaGluLysGlyGly-477,

y en la que dicha proteína no es SEC ID N.ºs: 1200, 1202, 1204, 3179, 3180, 3181, 3182, 3183, o 3184 del documento WO99/57280.

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