PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:
2000 - 4395

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:

C 12 N	15/31	A 61 K	48/00
C 12 N	1/21		
C 07 K	14/22		
C 07 K	16/12		
G 01 N	33/53		
G 01 N	33/569		
A 61 K	39/095		
A 61 K	39/40		

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **26.05.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **26.05.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/9811260**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.07.2001**
(Věstník č. 7/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/EP99/03603**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/61620**

(71) Přihlašovatel:
SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S. A., Rixensart, BE;
UNIVERSITY OF UTRECHT, Utrecht, NL;

(72) Původce:
Ruelle Jean-Louis, Rixensart, BE;
Tommassen Johannes Petrus Maria, Utrecht, NL;

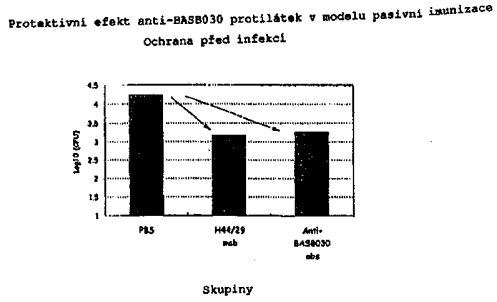
(74) Zástupce:
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Antigenní polypeptidy Neisseria meningitidis, příslušné polynukleotidy a protektivní protilátky

(57) Anotace:

Řešení poskytuje BASB030 polypeptidy N.meningitidis a polynukleotidy kódující BASB030 polypeptidy a metody pro produkci takových polypeptidů rekombinantními technikami. Rovněž poskytuje protilátky a jejich diagnostické, profylaktické a terpeutické použití.



CZ 2000 - 4395 A3

11.04.01
PV2000-4395

Antigenní polypeptidy Neisseria meningitidis, příslušné polynukleotidy a protektivní protilátky

27991

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká polynukleotidů (zde označovaných jako "BASB030 polynukleotidy", polypeptidů kódovaných uvedenými polynukleotidy (které jsou zde označovány jako "BASB030" nebo "BASB030 polypeptidy"), rekombinantních materiálů a způsobů jejich přípravy. V jiném aspektu se předkládaný vynález týká způsobů použití takových polypeptidů a polynukleotidů, včetně vakcín proti bakteriálním infekcím. V dalším aspektu se vynález týká diagnostických testů pro detekci infekce některými patogeny.

Dosavadní stav techniky

Neisseria meningitidis (meningokok) je Gram-negativní bakterie často izolovaná z lidských horních cest dýchacích. Občas způsobuje invazivní bakteriální onemocnění, jako je bakteriemie a meningitida. Incidence meningokokových onemocnění vykazuje geografické a sezónní výkyvy (Schwartz, B., Moore, P.S., Broome, C.V.; Clin. Microbiol. Rev. 2 (Supplements), S18-S24, 1989). Nejčastěji jsou onemocnění v zemích mírného pásu je způsobena kmeny seroskupiny B a incidence je od 1-10/100000/rok v celkové populaci a někdy dosahuje i vyšších hodnot (Kaczmarski, E:B., (1997), Commun. Dis. Rep. Rev. 7: R55-9, 1995; Scholten, R.J.P.M., Bijlmer, H.A., Poolman, J.T., et al., Clin. Infect. Dis. 16: 237-246, 1993; Cruz, C., pavez, G., Aguilar, E. et al., Epidemiol Infest. 105: 119-126, 1990).

Vyskytují se epidemie způsobené seroskupinou A meningokoků, zejména v centrální Africe, které někdy dosahují incidence až 1000/100000/rok (Schwartz, B., Moore, P.S., Broome, C.V.; Clin. Microbiol. Rev. 2 (Supplements), S18-S24, 1989). Téměř všechny případy systémového meningokokového onemocnění jsou způsobeny seroskupinami A, B, C, W-135 a Y meningokoků a je dostupná tetravalentní A, C, W-135, Y polysacharidová vakcína (Armand, J., Armijon, F., mynard, M.C., Lafaix, C., J. Biol. Stand. 10: 335-39, 1982).

Polysacharidové vakcíny jsou v současnosti zlepšovány jejich chemickou konjugací na proteinové nosiče (Lieberman, J.M., Chiu, S.S., Wong, V.K., et al., JAMA 275: 1499-1503, 1996).

Vakcína proti seroskupině B není v současnosti dostupná, protože bylo zjištěno, že B kapsulární polysacharid je neimunogenní, pravděpodobně proto, že má strukturální podobnost s antigeny hostitele (Wyle, F.A., Artenstein, M.S., Brandt, M.L. et al., J. Infect. Dis., 126: 514-522, 1972; Finne, J.M., Leinonen, M., Makela, P.M. Lancet ii: 355-357, 1983).

Před mnoha lety začaly pokusy o vývoj vakcín proti zevní membráně meningokoků (de Moraes, J.C., Perkins, B., Camargo, M.C., et al., Lancet 340: 1074-1078, 1992; Bjune, G., Hoiby, E.A., Gronnesby, J.K. et al., 338: 1093-1096, 1991). Takové vakcíny vykazovaly účinnosti od 57% do 85% u starších dětí (> 4 roky) a adolescentů.

V těchto vakcínách je přítomno mnoho složek zevních membrán, jako je PorA, PorB, Rpm, Opc, Opa, FrpB a příspěvek těchto složek k pozorované ochraně musí být ještě objasněn.

11.04.01

Další složky zevní membrány bakterií byly definovány za použití zvířecích nebo lidských protilátek jako potenciálně použitelné pro indukci protektivní imunity, jako například TbpB a NspA (Martin, D., Cadieux, N., Hamel, J., Brodeux, B.R., J. Exp. Med., 185: 1173-1183, 1997; Lissolo, L., Maitre-Wilmotte, C., Dumas, P. et al., Inf. Immun. 63: 884-890, 1995). Mechanismy protektivní imunity zahrnují baktericidní aktivitu zprostředkovanou protilátkami a opsonofagocytosu.

Zvířecí model bakteriemie byl použit pro kombinování všech mechanismů zprostředkovaných protilátkami (Saukkonen, K., Leinonen, M., Abdillahi, H., Poolman, J.T., Vaccine 7: 325-328, 1989). Všeobecně se přijímá, že baktericidní mechanismy zprostředkované komplementem jsou zásadní pro imunitu proti meningokokovému onemocnění (Ross, S.C. Rosenthal, P.J., Berberic, H.M., Densen, P., J. Infect. Dis. 155: 1266-1275, 1987).

Frekvence infekcí Neisseria meningitidis se v posledních dekádách dramaticky zvýšila. Toto se přisuzuje objevení se kmenů s mnohotnou antibiotickou resistencí a zvětšující se populaci jedinců s oslabeným imunitním systémem. nyní není neobvyklé, že se izolují kmeny Neisseria meningitidis, které jsou resistentní na některá nebo na všechna standardní antibiotika. Tento fenomén vytváří potřebu nových antimikrobiálních činidel, vakcín, metod pro vyhledávání léků a diagnostických testů na tento organismus.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se týká BASB030, konkrétně BASB030 polypeptidů a BASB030 polynukleotidů, rekombinantních materiálů a způsobů pro jejich přípravu. V jiném aspektu se

11.04.01

vynález týká způsobů pro použití takových polypeptidů a polynukleotidů, včetně léčby a prevence mikrobiálních onemocnění, mimo jiné. V dalším aspektu se vynález týká diagnostických testů pro detekci onemocnění spojených s mikrobiálními infekcemi a stavy spojenými s takovými infekcemi, jako jsou testy pro detekci exprese nebo aktivity BASB030 polynukleotidů nebo polypeptidů.

Různé změny a modifikace spadající do rozsahu předkládaného vynálezu budou odborníkům v oboru jasné po prostudování následujícího popisu a z dalších částí předkládaného vynálezu.

Vynález se týká BASB030 polypeptidů a polynukleotidů, jak jsou podrobněji popsány dále. Přesněji, vynález se týká polypeptidů a polynukleotidů Neisseria meningitidis, které mají homologii aminokyselin s PilQ zevním membránovým proteinem Neisseria gonorrhoeae. Vynález se konkrétně týká BASB030 mající nukleotidové a aminokyselinové sekvence uvedené v SEQ ID NO: 1,3,5 a SEQ ID NO: 2,4,6, v příslušném pořadí. Je třeba si uvědomit, že sekvence uvedené v "Seznamu sekvencí" jsou pouze příklady provedení předkládaného vynálezu, protože odborníkům v oboru bude jasné, že takové sekvence mohou být použity v polynukleotidech obecně, včetně ribopolynukleotidů.

Polypeptidy

V jednom aspektu vynález poskytuje polypeptidy Neisseria meningitidis označované jako "BASB030" a "BASB030 polypeptidy", stejně jako jejich biologicky, diagnosticky, profylakticky, klinicky nebo terapeuticky použitelné varianty, a prostředky obsahující tyto polypeptidy.

11.04.01

Předkládaný vynález dále poskytuje:
(a) izolovaný polypeptid obsahující aminokyselinovou sekvenci, která má alespoň 85% identitu, lépe alespoň 90% identitu, ještě lépe alespoň 95% identitu, nejlépe alespoň 97-99% nebo úplnou identitu, se sekvencí uvedenou v SEQ ID NO: 2,4,6;
(b) polypeptid kódovaný izolovaným polynukleotidem obsahujícím polynukleotidovou sekvenci mající alespoň 85% identitu, lépe alespoň 90% identitu, ještě lépe alespoň 95% identitu, nejlépe alespoň 97-99% nebo úplnou identitu, se sekvencí uvedenou v SEQ ID NO: 1,3,5 v celé délce SEQ ID NO: 1,3,5, v příslušném pořadí; nebo
(c) polypeptid kódovaný izolovaným polynukleotidem obsahujícím polynukleotidovou sekvenci kódující polypeptid mající alespoň 85% identitu, lépe alespoň 90% identitu, ještě lépe alespoň 95% identitu, nejlépe alespoň 97-99% nebo úplnou identitu, se sekvencí uvedenou v SEQ ID NO: 2,4,6.

BASB030 polypeptidy uvedené v SEQ ID NO: 2,4,6 jsou BASB030 polypeptidy z Neisseria meningitidis kmenů ATCC 13090 a H44/76.

Vynález také poskytuje imunogenní fragment BASB030 polypeptidu, to znamená, nepřerušovanou část BASB030 polypeptidu, která má stejnou nebo v podstatě stejnou imunogenní aktivitu jako polypeptid obsahující aminokyselinovou sekvenci podle SEQ ID NO: 2,4,6. To znamená, že fragment (v případě potřeby navázaný na nosič) může vyvolat imunitní odpověď, která je namířena proti BASB030 polypeptidu. Takový imunogenní fragment může obsahovat, například, BASB030 polypeptid bez N-koncové vedoucí sekvence, a/nebo transmembránové domény a/nebo C-terminální ukotvovací domény. Ve výhodném aspektu obsahuje imunogenní fragment BASB030 podle předkládaného vynálezu v podstatě celou extracelulární

doménu polypeptidu, který má alespoň 85% identitu, lépe alespoň 90% identitu, ještě lépe alespoň 95% identitu, nejlépe alespoň 97-99% nebo úplnou identitu, se SEQ ID NO: 2,4,6 v celé délce SEQ ID NO: 2.

Fragment je polypeptid mající aminokyselinovou sekvenci, která je zcela stejná jako část, ale ne celá, aminokyselinová sekvence podle předkládaného vynálezu. Pro BASB030 polypeptidy může být fragment "volný" nebo může být součástí většího polypeptidu, ve kterém tvoří část nebo region, nejlépe jeden nepřetržitý region v jednom větším polypeptidu.

Výhodnými fragmenty jsou, například, zkrácené polypeptidy obsahující část aminokyselinové sekvence SEQ ID NO: 2,4,6 nebo její varianty, jako je nepřerušovaná série zbytků obsahujících amino- a/nebo karboxy-terminální aminokyselinovou sekvenci. Také výhodné jsou degradační formy polypeptidů podle předkládaného vynálezu produkované v hostitelských buňkách. Výhodné jsou také fragmenty charakterizované strukturálními nebo funkčními vlastnostmi, jako jsou fragmenty obsahující alfa-šroubovici a regiony vytvářející alfa-šroubovici, beta-list a regiony vytvářející beta-list, ohyby a regiony vytvářející ohyby, smyčky a regiony vytvářející smyčky, hydrofilní regiony, hydrofobní regiony, alfa-amfipatické regiony, beta-amfipatické regiony, flexibilní regiony, regiony vytvářející povrchy a regiony s vysokým antigenním indexem.

Dalšími výhodnými fragmenty jsou izolované polypeptidy obsahující aminokyselinovou sekvenci mající alespoň 15, 20, 30, 40, 50 nebo 100 nepřerušovaných aminokyselin z aminokyselinové sekvence SEQ ID NO: 2,4,6, nebo izolované polypeptidy obsahující aminokyselinovou sekvenci zkrácenou o

alespoň 15, 20, 30, 40, 50 nebo 60 sousedních aminokyselin ze SEQ ID NO: 2,4,6.

Fragmenty polypeptidů podle předkládaného vynálezu mohou být použity pro přípravu příslušných úplných polypeptidů za použití peptidové syntézy; proto mohou být tyto fragmenty použity jako meziprodukty pro přípravu kompletních polypeptidů podle předkládaného vynálezu.

Zejména výhodné jsou varianty se substitucí, delecí, adicí nebo kombinací uvedených změn na několika, 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 nebo 1 aminokyselině.

Polypeptidy nebo imunogenní fragmenty podle předkládaného vynálezu mohou být ve formě "zralého" proteinu nebo mohou být součástí většího proteinu, jako je prekursorový protein nebo fúzní protein. Je často výhodné přidat další aminokyselinové sekvence, které jsou sekrečními nebo vedoucími sekvencemi, sekvencemi usnadňujícími přečištění, jako jsou například sekvence tvořené mnoha histidinovými zbytky, nebo sekvence pro stabilizaci během rekombinantní produkce. Dále je také možné přidat exogenní polypeptid nebo lipidovou koncovku nebo polynukleotidové sekvence pro zvýšení imunogenního potenciálu konečné molekuly.

V jednom aspektu se vynález týká geneticky zpracovaných solubilních fúzních proteinů obsahujících polypeptid podle předkládaného vynálezu nebo jeho fragment a různé části konstantních regionů těžkých nebo lehkých řetězců imunoglobulinů různých podtříd (IgG, IgM, IgA, IgE). Jako imunoglobulin se výhodně používá konstantní část těžkého řetězce lidského IgG, zejména IgG1, ve kterém je fúze provedena v pantovém regionu. V konkrétním provedení může být

11.04.01

Fc část odstraněna prostým vložením štěpící sekvence, která může být štěpena krevním srážecím faktorem Xa.

Dále se vynález týká způsobů přípravy těchto fúzních proteinů genetickým inženýrstvím a jejich použití pro vyhledávání léků, diagnostiku a terapii. Další aspekt vynálezu se týká polynukleotidů kódujících takové fúzní proteiny. Příklady technologie fúzních proteinů jsou uvedeny v Mezinárodních patentových přihláškách č. WO 94/29458 a WO 94/22914.

Proteiny mohou být chemicky konjugovány nebo mohou být exprimovány jako rekombinantní fúzní proteiny, což umožňuje produkci vyšších množství v expresních systémech ve srovnání s nefúzovanými proteiny. Fúzní partner může napomáhat v dodání epitopů pro T-pomocné lymfocyty (imunologický fúzní partner), výhodně epitopů pro T pomocné lymfocyty rozpoznávané u člověka, nebo může napomáhat expresi proteinu (zesilovač exprese) pro dosažení vyššího výtěžku než při použití přirozeného rekombinantního proteinu. Výhodně je fúzní partner jak imunologickým fúzním partnerem, tak zesilovačem exprese.

Mezi fúzní partnery patří protein D od Haemophilus influenzae a nestrukturální protein z chřipkového viru, NS1 (hemagglutinin). Jiným fúzním partnerem je protein známý jako LytA. Výhodně je použita C-koncová část molekuly. LytA je odvozen od Streptococcus pneumoniae, kkterý syntetizuje N-acetyl-L-alanin amidasu, amidasu LytA (kódovanou lytA genem (Gene, 43 (1986), str. 265-272)), což je autolysin, který specificky degraduje některé vazby v peptidoglykanového skeletu. C-koncová doména LytA proteinu je odpovědná za afinitu pro cholin nebo některé analogy cholinu, jako je DEAE. Tato vlastnost byla použita pro vývoj E. coli C-LytA

11.04.01

expresních plasmidů, které jsou použitelné pro expresi fúzních proteinů. Přečištění hybridních proteinů obsahujících C-LytA fragment na amino-konci byla popsána dříve (Biotechnology: 10 (1992), str. 795-798). Je možno použít opakující se část LytA molekuly nacházející se na C konci od nukleotidu 178, například zbytky 188-305.

Předkládaný vynález také zahrnuje varianty výše uvedených polypeptidů, to znamená polypeptidy, které se liší od referenčních polypeptidů konzervativními substitucemi aminokyselin, při kterých je zbytek substituován jiným zbytkem s podobnými charakteristikami. Typicky jsou takové substituce provedeny mezi Ala, Val, Leu a Ile; Ser a Thr; mezi kyselými zbytky Asp a Glu; mezi Asn a Gln; a mezi bazickými zbytky Lys a Arg; nebo mezi aromatickými zbytky Phe a Tyr.

Polypeptidy podle předkládaného vynálezu mohou být připraveny jakýmkoliv vhodným způsobem. Mezi takové polypeptidy patří izolované přirozené polypeptidy, rekombinantně připravené polypeptidy, synteticky připravené polypeptidy nebo polypeptidy připravené kombinací těchto metod. Způsoby přípravy polypeptidů jsou dobře známé v oboru.

nejvýhodnější je, aby byl polypeptid podle předkládaného vynálezu odvozen od Neisseria meningitidis, nicméně, může být také získán z jiného organismu stejného taxonomického rodu. Polypeptid podle předkládaného vynálezu může být získán, například, z organismu stejného rodu nebo řádu.

Polynukleotidy

Předmětem předkládaného vynálezu jsou polynukleotidy kódující BASB030 polypeptidy, zejména polynukleotidy, které kódující polypeptid označený BASB030.

Ve výhodném provedení vynálezu obsahují polynukleotidy region kódující BASB030 polypeptidy obsahující sekvenci uvedenou v SEQ ID NO: 1,3,5, které zahrnují celý gen nebo jeho variantu.

BASB030 polynukleotidy uvedené v SEQ ID NO: 1,3,5 jsou BASB030 polynukleotidy od Neisseria meningitidis kmenů ATCC 13090 a H44/76.

V dalším aspektu vynález poskytuje izolované molekuly nukleové kyseliny kódující a/nebo exprimující BASB030 polypeptidy a polynukleotidy, zejména Neisseria meningitidis BASB030 polypeptidy a polynukleotidy, včetně, například, nezpracované RNA, ribozymální NA, mRNA, cDNA, genomové DNA, B- a Z-DNA. Další provedení vynálezu zahrnují biologicky, diagnosticky, profylakticky, klinicky nebo terapeuticky použitelné polynukleotidy a polypeptidy a jejich varianty, a prostředky obsahující tyto polypeptidy a polynukleotidy.

Další aspekt vynálezu se týká izolovaných polynukleotidů, včetně alespoň jednoho kompletního genu, které kódují BASB030 polypeptid mající odvozenou aminokyselinovou sekvenci podle SEQ ID NO: 2,4,6 a polynukleotidů blízce příbuzným těmto polynukleotidům a jejich variant.

Jiným výhodným provedením vynálezu je BASB030 polypeptid od Neisseria meningitidis obsahující nebo skládající se z aminokyselinové sekvence SEQ ID NO: 2,4,6 nebo její varianty.

Za použití zde uvedených informací, jako je polynukleotidová sekvence uvedená v SEQ ID NO: 1,3,5, může být polynukleotid kódující BASB030 polypeptid získán za použití standardních klonovacích a vyšetřovacích metod, jako jsou metody pro klonování a sekvenování chromosomálních DNA fragmentů z bakterií za použití buněk Neisseria meningitidis jako výchozího materiálu, za zisku klonu pro celou délku genu. Například, pro získání polynukleotidové sekvence podle předkládaného vynálezu, jako je polynukleotidová sekvence uvedená v SEQ ID NO: 1,3,5, se knihovna klonů chromosomální DNA Neisseria meningitidis v E. coli nebo jiném vhodném hostiteli sonduje radioaktivně značeným oligonukleotidem, výhodně 17-merovým nebo delším, odvozeným z částečné sekvence. Klony nesoucí DNA sekvenci identickou se sondou se mohou potom detekovat za použití přísných hybridizačních podmínek. Sekvencováním jednotlivých klonů identifikovaných hybridizací se sekvencovacími primery navrženými podle původní polypeptidové nebo polynukleotidové sekvence je možné potom prodloužit polynukleotidovou sekvenci v obou směrech za zisku sekvence celého genu. Výhodně je takové sekvencování provedeno, například, za použití denaturované dvouřetězcové DNA připravené z plasmidového klonu. Vhodné techniky jsou popsány v Maniatis, T., Fritsch, E.F., a Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)(viz zejména Screening By Hybridization 1.90 a Sequencing Denatured Double-Stranded DNA Templates 13,70). Pro získání sekvence kompletního genu může být také provedeno přímé sekvencování genomové DNA. V předkládaném vynálezu byl každý polynukleotid uvedený v SEQ ID NO: 1,3,5 objeven v DNA knihovně odvozené od Neisseria meningitidis.

11.04.01

Kromě toho, každá DNA sekvence uvedená v SEQ ID NO: 1,3,5 obsahuje otevřený čtecí rámec kódující protein mající přibližně stejný počet aminokyselinových zbytků jako SEQ ID NO: 2,4,6 s odvozenou molekulovou hmotností, která může být vypočítána za použití hmotnostní aminokyselinových zbytků způsobem známým v oboru.

Polynukleotid se SEQ ID NO: 1, mezi start kodonem na nukleotidu č. 1 a stop kodonem začínajícím na nukleotidu č. 2308 SEQ ID NO: 1, kóduje polypeptid SEQ ID NO: 2.

Polynukleotid se SEQ ID NO: 3, mezi start kodonem na nukleotidu č. 1 a stop kodonem začínajícím na nukleotidu č. 2308 SEQ ID NO: 3, kóduje polypeptid SEQ ID NO: 4.

Polynukleotid se SEQ ID NO: 5, mezi start kodonem na nukleotidu č. 1 a stop kodonem začínajícím na nukleotidu č. 2308 SEQ ID NO: 5, kóduje polypeptid SEQ ID NO: 6.

V dalším aspektu předkládaný vynález dále poskytuje izolovaný polynukleotid obsahující nebo skládající se z:
(a) polynukleotidové sekvence, která má alespoň 85% identitu, lépe alespoň 90% identitu, ještě lépe alespoň 95% identitu, nejlépe alespoň 97-99% nebo úplnou identitu, se sekvencí uvedenou v SEQ ID NO: 1,3,5 v celé délce SEQ ID NO: 1,3,5, v příslušném pořadí; nebo
(b) polynukleotidové sekvence kódující polypeptid, který má alespoň 85% identitu, lépe alespoň 90% identitu, ještě lépe alespoň 95% identitu, nejlépe alespoň 97-99% nebo úplnou identitu, s aminokyselinovou sekvencí uvedenou v SEQ ID NO: 2,4,6 v celé délce SEQ ID NO: 2,4,6, v příslušném pořadí.

Polynukleotidy kódující polypeptidy podle předkládaného vynálezu, včetně homologů a ortologů z kmenů jiných než Neisseria meningitidis, mohou být získány procesem, který zahrnuje krok vyšetřování vhodné knihovny za přísných hybridizačních podmínek (například za použití teplot v rozmezí od 45 do 65 ^{0}C a koncentrace SDS od 0,1-1%) vhodnou značenou nebo detekovatelnou sondou skládající se nebo obsahující sekvenci SEQ ID NO: 1,3,5 nebo její fragment; a izolování kompletního genu a/nebo genomových klonů obsahujících uvedenou polynukleotidovou sekvenci.

Vynález poskytuje polynukleotidovou sekvenci identickou v celé své délce s kódující sekvencí (otevřeným čtecím rámcem) v SEQ ID NO: 1,3,5. vynález také poskytuje kódující sekvenci pro zralý polypeptid nebo jeho fragment samotný, stejně jako kódující sekvenci pro zralý polypeptid nebo jeho fragment ve čtecím rámci s jinou kódující sekvencí, jako je sekvence kódující vedoucí nebo sekreční sekvenci, pre- nebo pro- nebo prepro-proteinovou sekvenci. Polynukleotid podle předkládaného vynálezu může také obsahovat alespoň jednu nekódující sekvenci, včetně, například, alespoň jedné nekódující 3' nebo 5' sekvence, jako je transkribovaná, ale netranslatovaná sekvence, terminační signály (jako jsou rho-dependentní a rho-independentní terminační signály), vazebná místa pro ribosomy, Kozakovy sekvence, sekvence stabilizující mRNA, introny a polyaenylační signály. Polynukleotidová sekvence může také obsahovat další kódující sekvence kódující další aminokyseliny. Například mohou být kódovány markerové sekvence usnadňující přečištění fusovaného polypeptidu. V některých provedeních vynálezu je markerovou sekvencí hexa-histidinový peptid, jak je dodáván v pQE vektoru (Qiagen, Inc.) a popsán v Genz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824 (1989), nebo HA peptidová koncovka (Wilson et al., Cell 37: 767

(1984), kde oba tyto peptidy mohou být použity pro přečištění na ně fúzované polypeptidové sekvence. Mezi polynukleotidy podle předkládaného vynálezu také patří, například, polynukleotidy obsahující strukturální gen a s ním asociované sekvence, které řídí expresi genu.

Nukleotidová sekvence kódující BASB030 polypeptid SEQ ID NO: 2,4,6 může být identická se sekvencí kódující polypeptid obsaženou v nukleotidech 1 až 2307 SEQ ID NO: 1, nebo se sekvencí kódující polypeptid obsaženou v nukleotidech 1 až 2307 SEQ ID NO: 3, nebo se sekvencí kódující polypeptid obsaženou v nukleotidech 1 až 2307 SEQ ID NO: 5, v příslušném pořadí. Alternativně to může být sekvence vzniklá v důsledku degenerace genetického kódu, která také kóduje polypeptid SEQ ID NO: 2,4,6.

Termín "polynukleotid kódující polypeptid", jak je zde použit, označuje polynukleotidy, které obsahují sekvenci kódující polypeptid podle předkládaného vynálezu, zejména bakteriální polypeptid a konkrétně polypeptid Neisseria meningitidis BASB030 mající aminokyselinovou sekvenci podle SEQ ID NO: 2,4,6. Termín také zahrnuje polynukleotidy, které obsahují jeden nepřerušovaný region nebo přerušovaný region kódující polypeptid (například polynukleotidy přerušené integrovaným fágem, integrovanou inserční sekvencí, integrovanou vektorovou sekvencí, integrovanou transposonovou sekvencí nebo přerušenou v důsledku RNA editace nebo reorganizace genomové DNA), společně s dalšími regiony, které mohou také obsahovat kódující a/nebo nekódující sekvence.

Vynález se dále týká variant zde popsaných polynukleotidů kódujících varianty polypeptidů mających odvozené aminokyselinové sekvence SEQ ID NO: 2,4,6. Fragmenty

11.04.01

polynukleotidů podle předkládaného vynálezu mohou být použity, například, pro syntetizování kompletních polynukleotidů podle předkládaného vynálezu.

Zejména výhodnými provedeními vynálezu jsou polynukleotidy kódující BASB030 varianty, které mají aminokyselinové sekvence BASB030 polypeptidu SEQ ID NO: 2,4,6, ve kterých bylo několik, 5 až 10, 1 až 5, 1 až 3, 2, 1 nebo žádný z aminokyselinových zbytků substituováno, modifikováno, deletováno a/nebo přidáno, nebo které byly upraveny kombinací těchto změn. Zejména výhodné jsou ty silentní substituce, adice a delece, které nemění vlastnosti a aktivity BASB030 polypeptidu.

Dalším výhodným provedením vynálezu jsou polynukleotidy, které jsou z alespoň 85% identické v celé své délce s polynukleotidem kódujícím BASB030 polypeptid mající aminokyselinovou sekvenci uvedenou v SEQ ID NO: 2,4,6 a polynukleotidy, které jsou komplementární k takovým polynukleotidům. Z tohoto hlediska jsou zejména výhodné polynukleotidy identické z alespoň 90% v celé své délce, a lépe identické z alespoň 95%. Ještě výhodnější jsou polynukleotidy identické z alespoň 97%, lépe 98% a nejlépe z alespoň 99%.

Výhodným provedením jsou polynukleotidy kódující polypeptidy, které si zachovávají v podstatě stejnou biologickou funkci nebo aktivitu jako zralý polypeptid kódovaný DNA podle SEQ ID NO: 1,3,5.

V některých provedeních vynálezu jsou poskytnuty polynukleotidy, které hybridizují, zejména za přísných podmínek, na BASB030 polynukleotidové sekvence, jako jsou polynukleotidy uvedené v SEQ ID NO: 1,3,5.

11.04.01

Vynález se dále týká polynukleotidů, které hybridizují na zde uvedené polynukleotidové sekvence. Zde se vynález zejména týká polynukleotidů, které hybridizují za přísných podmínek na polynukleotidy podle předkládaného vynálezu. Termín "přísné podmínky" a "přísné hybridizační podmínky" znamená, že hybridizace probíhá pouze tehdy, pokud existuje alespoň 95% a lépe alespoň 97% identita mezi sekvencemi. Konkrétním příkladem přísných hybridizačních podmínek je inkubace přes noc při 42 ^{0}C v roztoku obsahujícím: 50% formamid, 5x SSC (150 mM NaCl, 15 mM citrat trojsodný), 50 mM fosforečnanu sodného (pH 7,6), 5x Denhartův roztok, 10% dextran síran a 20 μg/ml denaturované, rozetřené lososí spermatické DNA, kde po inkubaci následuje promytí hybridizační membrány v 0,1 x SSC při přibližně 65 ^{0}C. Hybridizační a promývací podmínky jsou dobře známé a jsou uvedeny například v Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory manual, 2. vydání, Cold Spirng Harbor, N.Y., (1989), zejména v kapitole 11. Hybridizace v roztoku může být provedena za použití polynukleotidových sekvencí podle předkládaného vynálezu.

Vynález také poskytuje polynukleotidy skládající se z nebo obsahující polynukleotidovou sekvenci získanou vyšetřováním vhodné knihovny obsahující kompletní gen pro polynukleotidovou sekvenci uvedenou v SEQ ID NO: 1,3,5 za přísných hybridizačních podmínek za použití sondy mající sekvenci uvedené polynukleotidové sekvence uvedené v SEQ ID NO: 1,3,5 nebo jejího fragmentu; a způsob pro izolování uvedené polynukleotidové sekvence. Fragmenty použitelnými pro získání takového polynukleotidu jsou, například, sondy a primery zde popsané.

jak zde je uvedeno pro polynukleotidové testy podle předkládaného vynálezu, mohou být polynukleotidy podle předkládaného vynálezu použity jako hybridizační sondy pro RNA, cDNA a genomovou DNA pro izolaci kompletních cDNA a genomových klonů kódujících BASB030 a pro izolaci cDNA a genomových klonů jiných genů, které mají vysokou identitu, zejména vysokou identitu sekvence, s BASB030 genem. Takové sondy budou obvykle obsahovat alespoň 15 nukleotidových zbytků nebo párů bazí. Výhodně budou takové sondy obsahovat alespoň 30 nukleotidových zbytků nebo párů bazí a mohou obsahovat alespoň 50 nukleotidových zbytků nebo párů bazí. Zejména výhodné sondy obsahují alespoň 20 a méně než 30 nukleotidových zbytků nebo párů bazí.

Kódující region BASB030 genu může být izolován za použití DNA sekvence uvedené v SEQ ID NO: 1,3,5 pro syntézu oligonukleotidové sondy. značený oligonukleotid mající sekvenci komplementární k sekvenci genu podle předkládaného vynálezu se potom použije k vyšetřování knihovny cDNA, genomové DNA nebo mRNA pro určení toho, na který člen knihovny sonda hybridizuje.

V oboru existuje několik metod pro získání kompletních DNA nebo kratších DNA, jako jsou například metody na bázi rychlé amlifikace konců cDNA (RACE) (viz například Frohman et al., PNAS USA 85: 8998-9002, 1988). Nové modifikace této techniky, jako je například Marathon^{tm} technologie (Clontech laboratories Inc.), významně zjednodušily prohledávání delších cDNA. V Marathon^{tm} technologii se cDNA připraví z mRNA extrahované z vybrané tkáně a 'adaptorová' sekvence se liguje na každý konec. Potom se provede amplifikace nukleové kyseliny (PCR) pro amplifikaci "chybějícího" 5' konce DNA za použití kombinace oligonukleotidových primerů specifických pro gen a

11.04.01

pro adaptor. PCR se potom opakuje za použití "nested" primerů, to znamená primerů navržených pro tepelnou reakci s amplifikovaným produktem (obvykle se jedná o primer specifický pro adaptor, který se tepelně naváže dále 3' na adaptorovou sekvenci a o primer specifický pro gen, který se tepelně naváže dále 5' na vybranou genovou sekvenci). Produkt této reakce se potom analyzuje DNA sekvencováním a kompletní DNA se připraví navázáním produktu přímo na existující DNA za vzniku kompletní sekvence, nebo provedením samostatné PCR pro kompletní sekvenci za použití nové informace o sekvenci pro návrh 5' primeru.

Polynukleotidy a polypeptidy podle předkládaného vynálezu mohou být použity, například, jako výzkumná činidla a materiály pro vývoj léků a diagnostických činidel pro onemocnění, zejména lidská onemocnění, jak je uvedeno dále v souvislosti s polynukleotidovými testy.

Polynukleotidy podle předkládaného vynálezu, které jsou oligonukleotidy odvozenými ze SEQ ID NO: 1-6, mohou být použity ve zde uvedených způsobech, výhodně v PCR, pro stanovení toho, zda jsou polynukleotidy podle předkládaného vynálezu transkribovány v bakteriích v infikované tkáni. Je známo, že takové sekvence jsou také použitelné pro diagnostiku stadia infekce a typu patogenu.

Vynález také poskytuje polynukleotidy, které kódují polypeptidy, které jsou zralými proteiny, plus další amino- nebo karboxy-koncové aminokyseliny, nebo aminokyseliny uvnitř zralého polypeptidu (například tehdy, je-li zralá forma tvořena více než jedním polypeptidovým řetězcem). Takové sekvence mhou mít význam pro zpracování proteinu z prekursoru na zralou formu, mohou umožňovat transport proteinu, mohou

11.04.01

zkracovat nebo prodlužovat poločas proteinu nebo mohou usnadňovat manipulaci s proteinem při testech nebo při produkci.Obecně, in vivo mohou být tyto další aminokyseliny odstraněny ze zralého proteinu buněčnými enzymy.

Pro každý polynukleotid podle předkládaného vynálezu je poskytnut polynukleotid komplementární k uvedenému polynukleotidu. Je výhodné, aby tyto komplementární polynukleotidy byly zcela komplementární k příslušnému polynukleotidu.

Prekursorový protein, který má zralou formu polypeptidu fúzovanou na jednu nebo více prosekvencí, může být inaktivní formou polypeptidu. Když jsou prosekvence odstraněny, tak jsou takové inaktivní prekursory obvykle aktivovány. některé nebo všechny takové prosekvence mohou být odstraněny před aktivací. Obecně se takové prekursory označují jako preproteiny.

kromě standardních označení A, G, C T/U pro nukleotidy může být v popisu polynukleotidů podle předkládaného vynálezu použito také označení "N". "N" označuje to, že v uvedené pozici DNA nebo RNA sekvence se může vyskytovat jakýkoliv ze čtyř DNA nebo RNA nukleotidů, s tou výjimkou, že je výhodné, aby N nebyla nukleová kyselina, která by v kombinaci se sousedními nukleotidovými pozicemi, při čtení ve správném čtecím rámci, mohla vytvořit předčasný terminační kodon v takovém čtecím rámci.

Souhrnně, polynukleotid podle předkládaného vynálezu může kódovat zralý protein, zralý protein s vedoucí sekvencí (který může být označován jako preprotein), prekursor zralého prtoeinu obsahující jednu nebo více prosekvencí, které nejsou vedoucími sekvencemi preproteinu, nebo preprotein, který je

11.04.01

prekursorem preproteinu obsahujícího vedoucí sekvenci a jednu nebo více prosekvencí, které jsou obvykle odstraněny během zpracování, při kterém vznikají aktivní a zralé formy polypeptidu.

V jednom aspektu vynález poskytuje použití polynukleotidu podle předkládaného vynálezu pro terapeutické nebo profylaktické účely, zejména pro genetickou imunizaci.

Použití polynukleotidu podle předkládaného vynálezu v genetické imunizaci bude výhodně využívat vhodnou metodu podání, jako je přímá injekce plasmidové DNA do svalů (Wolff et al., Hum. Mol. Genet. (1992), 1: 363; Manthorpe et al., Hum. Gene Ther. (1983), 4: 419), podání DNA v komplexu se specifickými proteinovými nosiči (Wu et al., J. Biol. Chem. (1989), 264: 16985), současné srážení DNA s fosforečnanem vápenatým ((Benvenisty and Reshef, PNAS USA (1986) 83: 9551), enkapsulace DNA v různých formách liposomů (Kaneda et al., Science (1989) 243: 375), ostřelování částicemi tang et al., Nature (1992) 356:152; Eisenbraun et al., DNA Cell Biology (1993), 12: 791) a in vivo infekce za použití klonovaných retrovirových vektorů (Seeger et al., PNAS USA (1984) 81: 5849).

Vektory, hostitelské buňky, expresní systémy

Vynález se také týká vektorů, které obsahují polynukleotid nebo polynukleotidy podle předkládaného vynálezu, hostitelských buněk, které jsou geneticky zpracované vektory a produkce polypeptidů podle předkládaného vynálezu rekombinantními technikami. Bezbuněčné translační systémy mohou být také použity pro produkci takových proteinů za

11.04.01

použití RNA odvozených z DNA konstruktů podle předkládaného vynálezu.

Rekombinantní polypeptidy podle předkládaného vynálezu mohou být připraveny způsoby dobře známými odborníkům v oboru z geneticky upravených hostitelských buněk obsahujících expresní systémy. V souladu s tím se vynález v dalším aspektu týká expresních systémů, které obsahují polynukleotid nebo polynukleotidy podle předkládaného vynálezu, hostitelských buněk, které jsou geneticky zpracované takovými expresními systémy a produkce polypeptidů podle předkládaného vynálezu rekombinantními technikami.

Pro rekombinantní produkci polypeptidů podle předkládaného vynálezu mohou být hostitelské buňky geneticky upraveny tak, aby inkorporovaly expresní systémy nebo jejich části nebo polynukleotidy podle předkládaného vynálezu. Vložení polynukleotidu do hostitelské buňky může být provedeno způsoby popsanými ve standardních laboratorních manuálech, jako například v Davis et al., BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, (1986), a v Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989), kterými je, například, transfekce za použití fosforečnanu vápenatého, transfekce zprostředkovaná DEAE-dextranem, transvekce, mikroinjekce, transfekce zprostředkovaná kationickými lipidy, elektroporace, transdukce, "scrape loading", balistická transfekce a infekce.

Příklady vhodných hostitelů zahrnují bakteriální buňky, jako jsou streptokoky, staphylokoky, enterokoky, E. coli, streptomycety, kyanobakterie, Bacillus subtilis, Moraxella catarrhalis, Haemophilus influenzae a Neisseria meningitidis; houby, jako jsou kvasinky, Kluveromyces, Saccharomyces,

11.04.01

basidiomyces, candida albicans a Aspergillus; hmyzí buňky jako jsou Drosophila S2 a Spodoptera Sf9; živočišné buňky jako jsou CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, 293, CV-1 a Bowes melanomové buňky; a rostlinné buňky, jako jsou buňky gymnospermu a angiospermu.

Různé expresní systémy mohou být použity pro produkci polypeptidů podle předkládaného vynálezu. Mezi takové vektory patří, mimo jiné, chromosomální, episomální a virové vektory, například vektory odvozené od bakteriálních plasmidů, bakteriofágů, transposonů, kvasinkových episomů, inserčních elementů, kvasinkových chromosomálních elementů, z virů jako jsou baculoviry, papova viry, SV40, viry vakcinie, adenoviry, drůbeží pox viry, pseudorabies viry, picornaviry, retroviry a alfaviry a vektory odvozené z jejich kombinací, jako jsou vektory připravené z plasmidových a bakteriofágových genetických elementů, jako jsou kosmidy a fagemidy. Expresní systém může obsahovat kontrolní regiony, které regulují zamýšlenou expresi. Obecně, jakýkoliv systém nebo vektor vhodný pro udržování, propagaci nebo expresi polynukleotid$ a/nebo pro expresi polypeptidu v hostiteli může být použit pro expresi v předkládaném vynálezu. Vhodná DNA sekvence může být insertována do expresního systému jakoukoliv z běžných technik, jako jsou například techniky popsané v Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL (výše).

V rekombinantních expresních systémech v eukaryotických organismech může exprimovaný polypeptid obsahovat pro sekreci translatovaného proteinu do lumen endoplasmatického retikula, do periplasmatického prostoru nebo do extracelulárního prostředí vhodné sekreční signály. Signály mohou být endogenní k polypeptidu nebo se může jednat o heterologní signály.

11.04.01

Polypeptidy podle předkládaného vynálezu mohou být získány a přečištěny z rekombinantních buněčných kultur dobře známými technikami, jako je srážení síranem amonným nebo ethanolem, extrakce kyselinou, anionová nebo kationová iontoměničová chromatografie, fosfocelulosová chromatografie, chromatografie využívající hydrofobní interakce, afinitní chromatografie, hydroxyapatitová chromatografie a lektinová chromatografie. Nejlépe se pro přečištění použije afinitní chromatografie s ionty kovů (IMAC). Dobře známé techniky pro skládání proteinů mohou být použity pro regeneraci aktivní konformace, když je polypeptid denaturován během intracelulární syntézy, izolace nebo přečištění.

Expresním systémem může být také rekombinantní živý mikroorganismus, jako je virus nebo bakterie. vybraný gen může být insertován do genomu živého rekombinantního viru nebo bakterie. Inokulace a in vivo infekce tímto vektorem povede k in vivo expresi antigenu a k indukci imunitní odpovědi. Mezi viry a bakterie použitelné pro tento účel patří například: poxviry (například virus vakcinie, drůbeží pox virus, kanárčí pox virus), alfaviry (Sindbis virus, Semliki forest virus, virus Venezuelské koňské encephalitidy), adenoviry, adeno-asociované viry, picornaviry (poliovirus, rhinovirus), herpesviry (virus varicella-zoster, atd.), Listeria, Salmonella, Shigella, Neisseria, BCG. Tyto viry a bakterie mohou být virulentní, nebo mohou být atenuované různými způsoby pro získání živých vakcín. Takové živé vakcíny také tvoří součást předkládaného vynálezu.

Diagnostické, prognostické, serotypizační a mutační testy

Předkládaný vynález se také týká použití BASB030 polynukleotidů a polypeptidů podle předkládaného vynálezu jako

11.04.01

diagnostických činidel. Detekce BASB030 polynukleotidů a/nebo polypeptidů v eukaryotech, zejména v savcích, zejména v lidech, je diagnostickou metodou pro diagnostiku onemocnění, určení rozsahu onemocnění nebo odpovědi infekčního organismu na léčbu. Eukaryoti, zejména savci, zejména lidé, zejména jedinci infikovaní organismem obsahujícím BASB030 gen nebo protein nebo v podezření z takové infekce, mohou být vyšetřováni na nukleokyselinové nebo aminokyselinové úrovni za použití mnoha známých technik, stejně jako za použití zde uvedených metod.

Polypeptidy a polynukleotidy pro prognostickou, diagnostickou nebo jinou analýzu mohou být získány z domněle infikovaných a/nebo infikovaných vzorků od jedince. Polynukleotidy z jakéhokoliv takového zdroje, zejména DNA nebo RNA, mohou být použity pro detekci přímo nebo mohou být amplifikovány enzymaticky za použití PCR nebo jakékoliv jiné amplifikační techniky před analýzou. RNA, zejména mRNA, cDNA a genomová DNA mohou být použity stejným způsobem. Za použití amplifikace může být charakterizace druhu a kmenu infekčního nebo přítomného organismu u jedince provedena analýzou genotypu vybraného polynukleotidu organismu. Delece a inserce mohou být detekovány podle změny velikosti amplifikovaného produktu ve srovnání s genotypem referenční sekvence získané od příbuzného organismu, výhodně od jiného druhu stejného rodu nebo od jiného kmenu stejného druhu. Bodové mutace mohou být identifikovány hybridizací amlifikované DNA na značené BASB030 polynukleotidové sekvence. Perfektně nebo významně odpovídající sekvence mohou být odlišeny od neúplně nebo významněji chybně spárovaných duplexů trávením DNAsou nebo RNAsou, pro DNA a RNA v příslušném pořadí, nebo detekcí rozdílů v teplotách tání nebo kinetikách renaturace. Odlišnosti v polynukleotidové sekvenci mohou být také

11.04.01

detekovány podle alterací v elektroforetické mobilitě polynukleotidových fragmentů v gelech ve srovnání s referenční sekvencí. Toto může být provedeno s nebo bez denaturačních činidel. Odlišnosti v polynukleotidech mohou být také detekovány přímým sekvencováním DNA nebo RNA. Viz například Myers et al., Science 230: 1242 (1985). Změny sekvence ve specifických místech mohou být také detekovány nukleasovými protektivními testy, jako jsou RNAsové, V1 a S1 protektivní testy, nebo chemickým štěpením. Viz, například, Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4397-4401 (1985).

V jiném provedení může být připravena sada oligonukleotidových sond obsahujících BASB030 nukleotidovou sekvenci nebo její fragmenty pro provedení účinného vyhledávání, například, genetických mutací, určování serotypu, taxonomickou klasifikaci nebo identifikaci. Způsoby přípravy sad jsou dobře známé a mohou být použity pro vyřešení mnoha problémů v molekulární genetice, jako je genová exprese, genetická vazba a genetická variabilita (viz například Chee et al., Science 274: 610 (1996)).

Tak se v dalším aspektu předkládaný vynález týká diagnostického kitu, který obsahuje:
(a) polynukleotid podle předkládaného vynálezu, výhodně nukleotidovou sekvenci SEQ ID NO: 1,3,5, nebo její fragment;
(b) nukleotidovou sekvenci komplementární k sekvenci uvedené v bodě (a);
(c) polypeptid podle předkládaného vynálezu, výhodně polypeptid SEQ ID NO: 2,4,6, nebo jeho fragment; nebo
(d) protilátku k polypeptidu podle předkládaného vynálezu, výhodně polypeptidu SEQ ID NO: 2,4,6.

11.04.01

Je třeba si uvědomit, že v jakémkoliv takovém kitu může (a), (b), (c) nebo (d) tvořit základní složku. Takové kity budou použitelné v diagnostice onemocnění nebo náchylnosti k onemocnění, mimo jiné.

vynález se také týká použití polynukleotidů podle předkládaného vynálezu jako diagnostických činidel. Detekce mutované formy polynukleotidu podle předkládaného vynálezu, výhodně SEQ ID NO: 1,3,5, která je spojena s onemocněním nebo patogenním potenciálem, poskytne diagnostický prostředek, který napomůže, nebo stanoví, diagnosu onemocnění, prognosu průběhu onemocnění, určí rozsah onemocnění nebo určí náchylnost k onemocnění, která je důsledkem snížené exprese, nadměrné exprese nebo změněné exprese polynukleotidu. Organismy, zejména infekční organismy, nesoucí mutace v takovém polynukleotidu, mohou být detekovány na polynukleotidové úrovni různými technikami, jako jsou techniky zde popsané.

Buňky z organismů nesoucích mutace nebo polymorfismy (alelické variace) v polynukleotidu a/nebo polypeptidu podle předkládaného vynálezu mohou být také detekovány na polynukleotidové nebo polypeptidové úrovni různými technikami, například za účelem serotypizace. Například, RT-PCR může být použita pro detekci mutací v RNA. Zejména výhodné je použití RT-PCR společně s automatickým detekčním systémem, jako je například Gene Scan. RNA, cDNA nebo genomová DNA mohou být použity pro stejný účel. Například PCR primery komplementární k polynukleotidu kódujícímu BASB030 polypeptid mohou být použity pro identifikaci a analýzu mutací.

Vynález dále poskytuje primery, které mají z 5' a/nebo 3' konce odstraněny 1, 2, 3 nebo 4 nukleotidy. Tyto primery mohou

11.04.01

být použity, například, pro amplifikaci BASB030 DNA a/nebo RNA izolované ze vzorku od jedince, jako je tělesný vzorek. Primery mohou být použity pro amplifikaci polynukleotidu izolovaného od infikovaného jedince a tento polynukleotid může být potom zpracován různými technikami pro hodnocení polynukleotidové sekvence. Tímto způsobem mohou být detekovány mutace v polynukleotidové sekvenci a může být použit pro diagnostiku a/nebo stanovení prognosy infekce nebo jejího stadia nebo serotypu a/nebo pro klasifikaci infekčního agens.

Vynález dále poskytuje způsob pro diagnostiku onemocnění, výhodně bakteriální infekce, přesněji infekce způsobené Neisseria meningitidis, který zahrnuje stanovení zvýšené exprese polynukleotidu majícího sekvenci SEQ ID NO: 1,3,5 ve vzorku od jedince. Zvýšená nebo snížená exprese BASB030 polynukleotidu může být měřena jakoukoliv metodou pro kvantifikaci polynukleotidů, jako je například amplifikace, PCR, RT-PCR, RNAsové chránění, Northernova hybridizace, spektrometrie a jiné hybridizační metody.

Dále, diagnostické testy podle předkládaného vynálezu pro detekci nadměrné exprese BASB030 polypeptid ve srovnání s normálními kontrolními vzorky tkáně mohou být použity, například, pro detekci přítomnosti infekce. Testovací techniky, které mohou být použity pro stanovení hladin BASB030 polypeptidu ve vzorku od jedince, jako je vzorek z těla, jsou dobře známé v oboru. Mezi takové testovací metody patří radioimunotesty, testy kompetitivní vazby, westernova hybridizace, protilátkové sandwichové testy, protilátková detekce a ELISA testy.

Polynukleotidy podle předkládaného vynálezu mohou být použity jako složky polynukleotidových sestav, výhodně v

11.04.01

sestavách s vysokou hustotou nebo mřížkách. Tyto sestavy s vysokou hustotou jsou zejména vhodné pro diagnostické nebo prognostické účely. Například, sada skvrn, kde každá skvrna obsahuje jiný gen, která dále obsahuje polynukleotid nebo polynukleotidy podle předkládaného vynálezu, může být použita pro sondování, například za použití hybridizace nebo amplifikace nukleových kyselin, za použití sondy získané ze vzorku od jedince, pro stanovení přítomnosti určité polynukleotidové sekvence nebo příbuzné sekvence u jedince. Taková přítomnost může ukazovat na přítomnost patogenu, zejména Neisseria meningitidis, a může být použita pro diagnostiku a/nebo prognostiku onemocnění nebo průběhu onemocnění. Výhodné jsou mřížky obsahující mnoho variant polynukleotidové sekvence SEQ ID NO: 1,3,5. Výhodné jsou také mřížky obsahující mnoho variant polynukleotidové sekvence kódující polypeptidovou sekvenci SEQ ID NO: 2,4,6.

Protilátky

Polypeptidy a polynukleotidy podle předkládaného vynálezu nebo jejich varianty, nebo buňky exprimující tyto polypeptidy a polynukleotidy mohou být použity pro produkci protilátek specifických pro takové polypeptidy a polynukleotidy.

V některých provedeních vynález poskytuje protilátky proti BASB030 polypeptidům a polynukleotidům.

Protilátky připravené proti polypeptidům a polynukleotidům podle předkládaného vynálezu mohou být získány podáním polypeptidů a/nebo polynukleotidů podle předkládaného vynálezu, nebo jejich fragmentů nesoucích epitopy, analogů nebo buněk exprimujících tyto substance, živočichům, výhodně jiným než lidem, za použití běžných protokolů. Pro přípravu

11.04.01

monoklonálních protilátek může být použita jakákoliv technika známá v oboru, která poskytuje protilátky produkované kontinuální buněčnou kulturou. Příklady jsou různé techniky, jak jsou popsány například v Kohler, G. and Milstein, C., Nature, 256: 495-497 (1975); Kozbor et al., Immunology Today 4: 72 (1983); Cole et al., str. 77-96 v MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc. (1985).

Techniky pro produkci jednořetězcových protilátek (US patent č. 4946778) mohou být adaptovány pro produkci jednořetězcových protilátek k polypeptidům nebo polynukleotidům podle předkládaného vynálezu. Také mohou být pro expresi humanizovaných protilátek imunospecifických pro polypeptidy nebo polynukleotidy podle předkládaného vynálezu použity transgenní myši nebo jiné organismy nebo zvířata, například savci.

Alternativně může být fágová zobrazovací technologie použita pro výběr genů pro protilátky s vazebnými aktivitami pro polypeptid podle předkládaného vynálezu, buď z repertoáru PCR amplifikovaných v-genů lymfocytů od lidí s potvrzenými anti-BASB030, nebo z naivních knihoven (McCafferty et al., (1990), Nature, 348: 552-554; Marks et al., (1992), Biotechnology 10: 779-783). Afinita těchto protilátek může být také zlepšena například kombinováním řetězců (Clackson et al., 1991, Nature 352: 628).

Výše popsané protilátky mohou být použity pro izolaci nebo pro identifikaci klonů exprimujících polypeptidy nebo polynukleotidy podle předkládaného vynálezu pro přečištění polypeptidů nebo polynukleotidů, například afinitní chromatografií.

Protilátky proti BASB030 - polypeptidu nebo BASB030 - polynukleotidu mohou být použity pro léčbu infekcí, zejména bakteriálních infekcí.

Polypeptidové varianty zahrnují antigenně, epitopově nebo imunologicky ekvivalentní varianty a tvoří jeden aspekt předkládaného vynálezu.

Výhodně je protilátka nebo její varianta modifikována tak, aby byla méně imunogenní u jedince. Například, pokud je jedincem člověk, tak je protilátka nejlépe "humanizovaná", ve které je komplementaritu určující region nebo regiony protilátky získané z hybridomu přenesen na lidskou monoklonální protilátku, jak je popsáno například v Jones et al., (1986), Nature 321: 522-525 nebo v Tempest et al., (1991), Biotechnology 9: 266-273.

Antagonisté a agonisté - testy a molekuly

Polypeptidy a polynukleotidy podle předkládaného vynálezu mohou být také použity pro hodnocení vazby malých molekul a ligandů v, například, buňkách, bezbuněčných přípravcích, chemických knihovnách a přirozených směsích. Tyto substráty mohou být přirozené substráty a ligandy, nebo se může jednat o strukturální nebo funkční mimetika. Viz například Coligan et al., Current Protocols in Immunology 1(2): kapitola 5 (1991).

Vyšetřovací metody mohou jednoduše měřit vazbu vyšetřované sloučeniny na polypeptid nebo polynukleotid, nebo na buněčné membrány nesoucí polypeptid nebo polynukleotid, nebo na fúzní protein obsahující polypeptid, za použití značkovacího činidla přímo nebo nepřímo asociovaného s vyšetřovanou sloučeninou. Alternativně může vyšetřovací metoda obsahovat kompetici se

11.04.01

značeným kompetitorem. Dále mohou tyto vyšetřovací metody testovat to, zda testovaná sloučenina vede ke tvorbě signálu generovaného aktivací nebo inhibicí polypeptidu nebo polynukleotidu, za použití detekčních systémů vhodných pro buňky obsahující polypeptid nebo polynukleotid. Inhibitory aktivace jsou obvykle testovány za přítomnosti známého agonisty a sleduje se vliv na aktivaci agonistou za přítomnosti testované sloučeniny. Konstitutivně aktivní polypeptidy a/nebo konstitutivně exprimované polypeptidy a polynukleotidy mohou být použity ve vyšetřovacích metodách pro inversní agonisty nebo inhibitory, za nepřítomnosti agonisty nebo inhibitoru, kdy se testuje, která sloučenina způsobuje inhibici aktivace polypeptidu nebo polynukleotidu. Dále, vyšetřovací metody mohou obsahovat kroky smísení vyšetřované sloučeniny s roztokem obsahujícím polypeptid nebo polynukleotid podle předkládaného vynálezu, za vzniku směsi, měřením aktivity BASB030 polypeptidu a/nebo polynukleotidu v e směsi a srovnání aktivity BASB030 polypeptidu a/nebo polynukleotidu ve směsi se standardem. Fúzní proteiny, jako jsou proteiny připravené z Fc části BASB030 polypeptidu, jak je zde popsáno, mohou být také použity pro vysoceúčinně skríningové testy pro identifikaci antagonistů polypeptidu podle předkládaného vynálezu, stejně jako fylogeneticky a/nebo funkčně příbuzných polypeptidů (viz D. Bennet et al., J. Mol. Recognition 8: 52-58 (1995); a K. Johanson et al., J. Biol. Chem. 270 (16): 9459-9471 (1995)).

Polynukleotidy, polypeptidy a protilátky, které se váží na a/nebo interagují s polypeptidem podle předkládaného vynálezu mohou být také použity ve vyšetřovacích metodách pro detekci vlivu přidávaných sloučenin na produkci mRNA a/nebo polypeptidu v buňkách. Například, ELISA test může být navržen pro měření secernovaných nebo buněčných koncentrací

11.04.01

polypeptidů za použití monoklonálních nebo polyklonálních protilátek a standardních metod. Tento postup může být použit pro detekci činidel, která mohou inhibovat nebo zvyšovat produkci polypeptidu (která jsou také označována jako antagonisté nebo agonisté, v příslušném pořadí), z vhodně upravených buněk nebo tkání.

Vynález také poskytuje způsob pro vyhledávání sloučenin pro identifikaci těch sloučenin, které zesilují (agonisté) nebo blokují (antagonisté) účinek BASB030 polypeptidů nebo polynukleotidů, zejména těch sloučenin, které jsou bakteriostatické a/nebo baktericidní. Vyšetřovací způsob může zahrnovat vysoce-účinné techniky. Například, pro vyšetřování na agonisty nebo antagonisty se syntetická reakční směs, buněčný kompartment, jako je membrána, buněčný obal nebo buněčná stěna, nebo přípravek z jakékoliv uvedené složky, obsahující BASB030 polypeptid a značený substrát nebo ligand takového polypeptidu, inkubuje za nepřítomnosti nebo za přítomnosti testované molekuly a agonistické nebo antagonistické působení na BASB030 polypeptid se odrazí ve snížení vazby značeného ligandu nebo ve snížené produkci produktu z takového substrátu. Molekuly, které se váží samovolně, tj. bez indukce efektů na BASB030 polypeptid, jsou pravděpodobně antagonisty. Molekuly, které se váží dobře a které zvyšují rychlost tvorby produktu ze substrátu, zvyšují přenos signálu nebo zvyšují aktivitu chemických kanálů, jsou antagonisty. Detekce rychlosti nebo množství produkce produktu ze substrátu přenosu signálu nebo aktivity chemických kanálů, může být zesílena použitím reporterového systému, Reporterové systémy, které mohou být použity pro tento účel, zahrnují například kolorimetrické systémy, přeměnu značeného substrátu na produkt, reporterové geny reagující na změnu aktivity

11.04.01

BASB030 polypeptidu nebo polynukleotidu a vazebné testy známé v oboru.

Jiným příkladem testu na BASB030 agonisty je kompetitivní test, který kombinuje BASB030 a potenciální agonisty s vazebnými molekulami pro BASB030, rekombinantními vazebnými molekulami pro BASB030, přirozenými substráty nebo ligandy, nebo mimetiky přirozených substrátů nebo ligandů, za podmínek vhodných pro test na kompetitivní inhibici. BASB030 může být značený, například radioaktivně nebo kolorimetrickou sloučeninou, takže může být přesně určen počet BASB030 molekul navázaných na vazebnou molekulu nebo přeměněných na produkt, což je nutné pro hodnocení účinnosti potenciálních antagonistů.

Mezi potenciální antagonisty patří, mimo jiné, malé organické molekuly, peptidy, polypeptidy a protilátky, které se váží na polypeptidy a/nebo polynukleotidy podle předkládaného vynálezu a tak inhibují nebo eliminují jejich aktivitu nebo expresi. Potenciálním antagonistou mohou být malé organické molekuly, peptidy, polypeptidy, jako jsou blízce příbuzné proteiny nebo protilátky, které se váží na stejné místo jako vazebná molekula, bez toho, že by indukovaly aktivity indukované BASB030, což brání působení nebo expresi BASB030 polypeptidů a/nebo polynukleotidů tím, že eliminují vazbu BASB030 polypeptidů a/nebo polynukleotidů.

Mezi potenciální antagonisty patří malé molekuly, které se váží na a obsazují vazebná místa na polypeptidu, čímž brání vazbě na buněčné vazebné molekuly, takže je zabráněno normální biologické aktivitě. Příklady takových malých molekul jsou, například, malé organické molekuly, peptidy nebo peptidům podobné molekuly. Mezi další potenciální antagonisty patří

11.04.01

protismyslné molekuly (pro popis těchto molekul viz Okano, J. Neurochem. 56: 560 (1991): OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AS ANTISENSE INHIBITORS OF GENE EXPRESSION, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)). Mezi výhodné potenciální antagonisty patří sloučeniny příbuzné s BASB030 a varianty BASB030.

V dalším aspektu se předkládaný vynález týká geneticky upravených rozpustných fúzních proteinů obsahujících polypeptid podle předkládaného vynálezu nebo jeho fragment, a různé části konstantních regionů těžkých nebo lehkých řetězců imunoglobulinů různých podtříd (IgG, IgM, IgA, IgE). Jako imunoglobulin se výhodně používá konstantní část těžkého řetězce lidského IgG, zejména IgG1, ve kterém je fúze provedena v pantovém regionu. V konkrétním provedení může být Fc část odstraněna prostým vložením štěpící sekvence, která může být štěpena krevním srážecím faktorem Xa. Dále se vynález týká způsobů přípravy těchto fúzních proteinů genetickým inženýrstvím a jejich použití pro vyhledávání léků, diagnostiku a terapii. Další aspekt vynálezu se týká polynukleotidů kódujících takové fúzní proteiny. Příklady technologie fúzních proteinů jsou uvedeny v Mezinárodních patentových přihláškách č. WO 94/29458 a WO 94/22914.

Každá z polynukleotidových sekvencí podle předkládaného vynálezu může být použita pro vyhledávání a vývoj antibakteriálních sloučenin. Kódovaný protein, po expresi, může být použit jako cíl pro vyhledávání antibakteriálních léčiv. Další polynukleotidové sekvence kódující amino-koncové regiony kódovaného proteinu nebo Shine-Delgarno nebo jiné sekvence usnadňující translaci příslušné mRNA mohou být použity pro konstrukci protismyslných sekvencí pro kontrolu exprese vybrané kódující sekvence.

11.04.01

Vynález také poskytuje použití polypeptidu, polynukleotidu, agonisty nebo antagonisty podle předkládaného vynálezu pro dosažení interference s počáteční fyzikální interakcí mezi patogenem nebo patogeny a eukarotickým organismem, obvykle člověkem, která je odpovědná za infekci. Konkrétně, molekuly podle předkládaného vynálezu mohou být použity pro prevenci adhese bakterií, zejména gram-pozitivních a/nebo gram-negativních bakterií, na eukaryotické, výhodně savčí, proteiny mezibuněčné hmoty na zavedené nástroje nebo na proteiny extracelulární buněčné hmoty v ránách; pro blokování bakteriální adhese mezi proteiny extracelulární buněčné hmoty u eukaryotického organismu a bakteriálními BASB030 proteiny zprostředkujícími tkáňové poškození a/nebo pro blokování normální progrese infekce iniciované jinak než implantací zavedených prostředků nebo chirurgickým výkonem.

V ještě dalším aspektu vynález poskytuje BASB030 agonisty a antagonisty, výhodně bakteriostatické nebo baktericidní agonisty a antagonisty.

Antagonisté a agonisté podle předkládaného vynálezu mohou být použity, například, pro prevenci, inhibici a/nebo léčbu onemocnění.

V dalším aspektu se vynález týká mimotopů polypeptidu podle předkládaného vynálezu. Mimotop je peptidová sekvence, dostatečně podobná přirozenému peptidu (sekvencí nebo strukturálně), která může být rozpoznávána protilátky, které rozpoznávají přirozený peptid; nebo může vyvolat tvorbu protilátek, které rozpoznávají přirozený peptid,když je navázán na vhodný nosič.

11.04.01

Peptidové mimotopy mohou být navrženy pro určitý účel adicí, delecí nebo substitucí vybraných aminokyselin. Tak mohou být peptidy modifikovány za účelem snadné konjugace na proteinový nosič. Pro některé chemické konjugační metody může být žádoucí, aby obsahovaly koncový cystein. Dále může být pro peptidy konjugované na proteinový nosič žádoucí, aby obsahovaly hydrofobní konec distálně od konjugovaného koncem peptidu, takže volný nekonjugovaný konec peptidu zůstává asociovaný s povrchem proteinového nosiče. Tak je peptid prezentován v konformaci, která nejblíže napodobuje konformaci peptidu v kontextu celé přirozené molekuly. například mohou být peptidy pozměněny tak, aby obsahovaly N-koncový cystein a C-terminální hydrofobní amidovanou koncovku. Alternativně může být provedena adice nebo substituce D-stereoizomerické formy jedné nebo více aminokyselin pro vytvoření požadovaného derivátu, například pro zvýšení stability peptidu.

Alternativně mohou být peptidové mimotopy identifikovány za použití protilátek,které se mohou vázat na polypeptidy podle předkládaného vynálezu, za použití technik jako je fágová zobrazovací technika (EP 0 552 268 B1). Tato technika generuje velký počet peptidových sekvencí,které napodobují strukturu přirozených peptidů a jsou proto schopné vazby na protilátky proti přirozenému peptidu, ale nemusí mít sami významnou homologii sekvence s přirozeným polypeptidem.

Vakcíny

Další aspekt předkládaného vynálezu se týká způsobu pro indukci imunologické odpovědi u jedince, zejména u savce, nejlépe u člověka, který zahrnuje očkování jedince BASB030 polynukleotidem a/nebo polypeptidem, nebo jejich fragmentem nebo variantou,pro vyvolání tvorby protilátkové a/nebo T-

lymfocytární odpovědi pro chránění jedince před infekcí, zejména před bakteriální infekcí, konkrétně před infekcí Neisseria meningitidis. Vynález také poskytuje způsoby, ve kterých taková imunologická reakce zpomaluje bakteriální replikaci. Ještě další aspekt předkládaného vynálezu se týká způsobu pro indukci imunologické odpovědi u jedince, při kterém je takovému jedinci podán nukleokyselinový vektor, sekvence, nebo ribozym pro řízení exprese BASB030 polynukleotidu a/nebo polypeptidu nebo jejich fragmentu nebo varianty, pro expresi BASB030 polynukleotidu a/nebo polypeptidu nebo jejich fragmentu nebo varianty in vivo, za účelem indukce imunologické reakce, jako je například protilátková a/nebo T-lymfocytární imunitní reakce, včetně, například, indukce T-lymfocytů produkujících cytokiny nebo cytotoxických T-lymfocytů, pro obranu uvedeného jedince, výhodně člověka, před onemocněním, bez ohledu na to, zda je již onemocnění u jedince přítomno či nikoliv. Jedním příkladem podání genu je jeho urychlení ve formě potahu na částicích do buněk. Takové nukleokyselinové vektory mohou obsahovat RNA, DNA, ribozym, modifikovanou nukleovou kyselinu, DNA/RNA hybrid, komplex DNA-protein nebo komplex RNA-protein.

Další aspekt předkládaného vynálezu se týká imunologických prostředků, které po podání jedinci, mohou indukovat imunologickou reakci u jedince proti BASB030 polynukleotidu a/nebo jím kódovaného polypeptidu, kde prostředky obsahují rekombinantní BASB030 polynukleotid a/nebo jím kódovaný polypeptid a/neo DNA a/nebo RNA kódující a exprimující antigen uvedeného BASB030 polynukleotidu, jím kódovaného polypeptidu nebo jiného polypeptidu podle předkládaného vynálezu. Imunologická reakce může být použita terapeuticky nebo profylakticky a může být ve formě protilátkové imunity a/nebo

11.04.01

buněčné imunity, jako je buněčná imunita vzniklá z CTL nebo CD4+ T-lymfocytů.

BASB030 polypeptid nebo jeho fragment může být fúzován s ko-proteinem nebo chemickou skupinou, která může, ale nemusí sama o sobě produkovat protilátky, ale která může stabilizovat první protein a produkovat fúzní nebo modifikovaný protein, který má antigenní a/nebo imunogenní vlastnosti, a výhodně protektivní vlastnosti. Fúzní rekombinantní proteiny výhodně dále obsahují antigenní ko-protein, jako je lipoprotein D od Haemophilus influenzae, glutathion-S-transferasu (GST) nebo β-galaktosidasu, nebo jakýkoliv jiný relativně velký ko-protein, který solubilizuje protein a usnadňuje jeho produkci a přečištění. Kromě toho, ko-protein může účinkovat jako adjuvans v tom smyslu, že obecně stimuluje imunitní systém organismu, kterému je protein podán. Ko-protein může být navázán na amino- nebo na karboxy-konec prvního proteinu.

Předkládaný vynález poskytuje prostředky, zejména vakcinační prostředky, a způsoby zahrnující polypeptidy a/nebo polynukleotidy podle předkládaného vynálezu a imunostimulační sekvence, jak jsou popsány například v Sato, Y. et al., Science 273: 352 (1996).

Předkládaný vynález také poskytuje způsoby použití popsaných polynukleotidů nebo jejich určitých fragmentů, o kterých bylo prokázáno, že kódují nevariabilní regiony bakteriálních povrchových proteinů, v polynukleotidových konstruktech používaných v takových genetických imunizačních pokusech na zvířecích modelech infekce Neisseria meningitidis. Takové pokusy budou zejména vhodné pro identifikaci proteinových epitopů schopných vyvolat profylaktickou nebo terapeutickou imunitní reakci. Předpokládá se, že tento postup

11.04.01

umožní následnou přípravu monoklonálních protilátek získaných z orgánu zvířete úspěšně odolávajícího infekci, za účelem vývoje profylaktických činidel nebo terapeutických činidel pro léčbu bakteriální infekce, zejména infekce Neisseria meningitidis, u savců, zejména u lidí.

Vynález také zahrnuje vakcinační prostředek obsahující imunogenní rekombinantní polypeptid a/nebo polynukleotid podle předkládaného vynálezu v kombinaci s vhodným nosičem, jako je farmaceuticky přijatelný nosič. Protože mohou být polynukleotidy a polypeptidy degradovány v žaludku, je výhodnější podávat je parenterálně, například podkožně, intramuskulárně, intravenosně nebo intradermálně. Mezi prostředky vhodné pro parenterální podání patří vodné a nevodné sterilní injekční roztoky, které mohou obsahovat antioxidační činidla, pufry, bakteriostatické sloučeniny a složky, které upravují izotonicitu prostředku s tělesnými kapalinami, výhodně krví, jedince; a nevodné a vodné sterilní suspenze, které mohou obsahovat suspendační činidla nebo zahušťovací činidla. Prostředky mohou být připraveny v jednodávkových nebo vícedávkových zásobnících, například v uzavřených ampulích nebo fiolách, a mohou být skladovány v lyofilizovaném stavu, který vyžaduje přidání sterilního kapalného nosiče bezprostředně před použitím.

Vakcinační prostředek podle předkládaného vynálezu může také obsahovat adjuvantní systém pro zesílení imunogenicity prostředku. Výhodně vyvolává adjuvantní systém přednostně odpověď Th1 typu.

Imunitní odpověď může být obecně rozdělena do dvou kategorií, na protilátkovou a buněčnou imunitní reakci (tradičně charakterizovanou protilátkovým a buněčným

11.04.01

efektorovým mechanismem obrany, v příslušném pořadí). tyto kategorie odpovědi se označují jako odpověď Th1 typu (buněčná odpověď) a odpověď Th2 typu (protilátková odpověď).

Extrémní Th1-reakce může být charakterizována tvorbou antigenně specifických, haplotypově restrihovaných cytotoxických T-lymfocytů a reakcí přirozených zabíječů. U myší jsou odpovědi Th1 typu často charakterizovány tvorbou protilátek podtřídy IgG2a, zatímco u lidí těmto protilátkám odpovídají protilátky IgG1. Th2 imunitní reakce jsou charakterizovány tvrobou široké škály imunoglobulinových izotypů, včetně IgG1, IgA a IgM (u myší).

Předpokládá se, že řídícím faktorem určujícím typ imunitní reakce jsou cytokiny. Vysoké hladiny cytokinů Th1 typu indukují buněčnou imunitní odpověď na daný antigen, zatímco vysoké hladiny cytokinů Th2 typu indukují humorální imunitní odpověď na daný antigen.

Rozlišení imunitní reakce Th1 a Th2 typu není absolutní. Ve skutečnosti vznikají u jedince imunitní odpovědi, které jsou predominantně Th1 nebo predominantně Th2. nicméně, často je vhodné hodnotit rodiny cytokinů tak, jak byly popsány na myších klonech CD4+ T-lymfocytů v Mossman and Coffman (Mosmann, T.R. and Coffman, R.L., (1989), Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, str. 145-173). Tradičně jsou reakce Th1 typu spojeny s produkcí IFN-γ a IL-2 cytokinů T-lymfocyty. další cytokiny často přímo spojené s indukcí imunitní reakce Th1 typu nejsou produkovány T-lymfocyty, jako je například IL-12. Naopak, reakce Th2 typu jsou asociovány se sekrecí IL-4, IL-5, IL-6 a IL-13.

Je známo, že některá adjuvans pro vakcíny jsou zejména vhodná pro stimulaci buď reakce Th1 typu, nebo Th2 typu. Tradičně je nejlepším ukazatelem rovnováhy mezi Th1:Th2 imunitní reakcí po vakcinaci nebo infekci přímé měření produkce Th1 nebo Th2 cytokinů T-lymfocyty in vitro po restimulaci antigenem, a/nebo měření poměru IgG1:IgG2 v protilátkové odpovědi specifické pro antigen.

Tak je adjuvans Th1 typu takové adjuvans, které přednostně stimuluje izolovanou populaci T-lymfocytů k produkci vysokých hladin cytokinů Th1 typu při restimulaci antigenem in vitro, a které indukuje vznik jak CD8+ cytotoxických T-lymfocytů, tak antigenně specifickou imunoglobulinovou odpověď asociovanou s izotypy Th1-typu.

Adjuvans, která přednostně stimulují odpověď Th1 typu, jsou popsána v Mezinárodní patentové přihlášce č. WO 94/00153 a ve WO 95/17209.

Jedním takovým adjuvans je 3-de-O-acylovaný monofosforyl lipid A (3D-MPL). Tento je znám z GB 2220211 (Ribi). Chemicky s jedná o směs 3-de-O-acylovaného monofosforyl lipidu A s 4, 5 nebo 6 acylovanými řetězci a je vyráběn Ribi Immunochem, Montana. Výhodná forma je 3-de-O-acylovaného monofosforyl lipidu A je popsána v Evropské patentové přihlášce 0 689 454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA).

Výhodně jsou částice 3D-MPL dostatečně malé pro to, aby mohly být sterilně filtrovány přes 0,22 mikronovou membránu (Evropská patentová přihláška 0 689 454). 3D-MPL může být přítomen v množství od 10 μg do 100 μg, lépe 25-50 μg na dávku, kdy dávka antigenu je obvykle v rozmezí 2-50 μg na dávku.

Jiným výhodným adjuvans je QS21, HPLC přečištěná netoxická frakce získaná z kůry Quillaja Saponaria Molina. Toto adjuvans může být volitelně smíseno s 3-de-O-acylovaným monofosforyl lipidem A (3D-MPL), volitelně společně s nosičem.

Způsob produkce QS21 je popsán v US patentu č. 5057540.

Nereaktogenní adjuvantní prostředky obsahující QS21 byly popsány dříve (WO 96/33739). bylo prokázáno, že takové prostředky obsahující QS21 a cholesterol jsou účinnými adjuvant stimulujícími Th1 odpověď, když jsou připraveny společně s antigenem.

Dalšími adjuvans, která přednostně stimulují odpověď Th1 typu, jsou imunomodulační oligonukleotidy, například nemethylované CpG sekvence, jak jsou popsány ve WO 96/02555.

Kombinování různých Th1-stimulačních adjuvans, jak byla uvedena výše, je také možná pro přípravu adjuvans, které je přednostním stimulátorem Th1 odpovědi. Například může být QS21 připraveno společně s 3D-MPL. Poměr QS21:3D-MPL je obvykle od 1:10 do 10:1, lépe od 1:5 do 5:1 a často 1:1. Výhodný poměr pro optimální synergii je 2,5:1 až 1:1 3D-MPL:QS21.

Výhodně je ve vakcinačním prostředku podle předkládaného vynálezu přítomen také nosič. Nosičem může být emulse olej ve vodě nebo sůl hliníku, jako je fosforečnan hlinitý nebo hydroxid hlinitý.

Výhodná emulse olej ve vodě obsahuje metabolisovatelný olej, jako je skvalen, α-tokoferol a Tween 80. V zejména výhodném provedení vakcinačních prostředků podle předkládaného

11.04.01

vynálezu jsou antigeny kombinovány s QS21 a 3D-MPL v takové emulsi. Dále může emulse olej ve vodě obsahovat span 85 a/nebo lecitin a/nebo trikaprylin.

Obvykle jsou při podání člověku QS21 a 3D-MPL přítomny ve vakcíně v množství od 1 μg do 200 μg, lépe 10-100 μg, nejlépe 10-50 μg na dávku. Emulse olej ve vodě obvykle obsahuje 2-10% skvalenu, 2-10% α-tokoferolu a 0,3-3% Tween 80.Výhodně je poměr skvalen:α-tokoferol rovný nebo menší než 1, čímž je dosaženo vyšší stability emulse. Span 85 může být také přítomen v koncentraci 1%. V některých případech je výhodné, aby vakcinační prostředek podle předkládaného vynálezu dále obsahoval stabilizační činidlo.

Netoxické emulse olej ve vodě výhodně obsahují netoxický olej, jako je například skvalen, emulgační činidlo, například Tween 80, ve vodném nosiči. Vodným nosičem může být, například, fosfatem pufrovaný salinický roztok.

Zejména účinný adjuvantní přípravek obsahující QS21, 3D-MPL a tokoferol v emulsi olej ve vodě je popsán ve WO 95/17210.

Předkládaný vynález také poskytuje polyvalentní vakcinační prostředek obsahující vakcinační prostředek podle předkládaného vynálezu v kombinaci s jinými antigeny, zejména antigeny použitelnými pro léčbu nádorů, autoimunitních onemocnění a příbuzných stavů. Takový polyvalentní vakcinační prostředek může obsahovat adjuvans indukující Th1 odpověď, jak je zde popsáno.

Je třeba si uvědomit, že ačkoliv je vynález popsán s ohledem na určité BASB030 polypeptidy a polynukleotidy, zahrnuje fragmenty přirozených polypeptidů a polynukleotidů a

podobné polypeptidy a polynukleotidy s adicemi, delecemi nebo substitucemi, které významně neovlivňují imunogenní vlastnosti rekombinantních polypeptidů a polynukleotidů.

Antigen může být také podán ve formě celé bakterie (živé či mrtvé) nebo ve formě subcelulárních frakcí, kde tato možnost zahrnuje také Neisseria meningitidis.

Prostředky, kity a způsoby podání

V dalším aspektu vynález poskytuje prostředky obsahující BASB030 polynukleotid a/nebo BASB030 polypeptid pro podání do buněk nebo do mnohobuněčných organismů.

Vynález se také týká prostředků obsahujících polynukleotidy a/nebo polypeptidy podle předkládaného vynálezu nebo jejich agonisty nebo antagonisty. Polypeptidy a polynukleotidy podle předkládaného vynálezu mohou být použity v kombinaci s nesterilním nebo sterilním nosičem nebo nosiči vhodnými pro použití v buňkách, tkáních nebo organismech, jako jsou farmaceutické nosiče vhodné pro podání jedinci. Takové prostředky obsahují, například, aditivní nebo terapeuticky účinné množství polypeptidu a/nebo polynukleotid podle předkládaného vynálezu a farmaceuticky přijatelný nosič nebo přísadu. Mezi takové nosiče patří, například, salinický roztok, pufrovaný salinický roztok, dextrosa, voda, glycerol, ethanol a jejich kombinace. Prostředek by měl odpovídat způsobu podání. Vynález se dále týká farmaceutických balení a kitů obsahujících jeden nebo více zásobníků naplněných jednou nebo více složkami výše uvedených prostředků podle předkládaného vynálezu.

Polypeptidy, polynukleotidy a jiné sloučeniny podle předkládaného vynálezu mohou být použity samostatně nebo společně s jinými sloučeninami, jako jsou terapeutické sloučeniny.

Farmaceutické prostředky mohou být podány jakýmkoliv účinným a vhodným způsobem, jako je například lokální, orální, rektální, vaginální, intravenosní, intraperitoneální, intramuskulární, podkožní, intranasální nebo intradermální podání.

V terapeutickém nebo profylaktickém použití může být aktivní činidlo podáno jedinci ve formě injekčního prostředku, například ve formě sterilní vodné disperze, výhodně izotonické.

V dalším aspektu se předkládaný vynález týká farmaceutických prostředků obsahujících terapeuticky účinné množství polypeptidu a/nebo polynukleotidu, jako je rozpustná forma polypeptidu a/nebo polynukleotidu podle předkládaného vynálezu, agonistického nebo antagonistického peptidu nebo sloučeniny s malou molekulou, v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo přísadou. Mezi takové nosiče patří například salinický roztok, pufrovaný salinický roztok, dextrosa, voda, glycerol, ethanol nebo jejich kombinace. Vynález se dále týká farmaceutických balení a kitů obsahujících jeden nebo více zásobníků naplněných jednou nebo více složkami výše uvedených prostředků podle předkládaného vynálezu. Polypeptidy, polynukleotidy a jiné sloučeniny podle předkládaného vynálezu mohou být použity samostatně nebo společně s jinými sloučeninami, jako jsou terapeutické sloučeniny.

11.04.01

Prostředek bude připraven pro určitý způsob podání, například pro systémové nebo orální podání. Mezi výhodné formy systémového podání patří injekční podání, výhodně intravenosní injekce. Mohou být použity také jiné formy injekčního podání, jako je podkožní, intramuskulární nebo intraperitoneální injekce. Alternativními způsoby systémového podání jsou transslizniční a transdermální podání za použití činidel podporujících penetraci, jako jsou žlučové soli nebo fusidové kyseliny nebo jiná detergentní činidla. Dále, pokud může být polypeptid nebo jiná sloučenina podle předkládaného vynálezu připravena v enterálním nebo enkapsulovaném prostředku, je také možné orální podání. Podání těchto sloučenin může být také lokální, například ve formě obkladů, past, gelů, roztoků, prášků a podobně.

Pro podání savcům, zejména lidem, se předpokládá, že denní dávka aktivního činidla bude v rozmezí od 0,01 mg/kg do 10 mg/kg, lépe přibližně 1 mg/kg. Lékař vždy určí dávku nejvhodnější pro jedince a tato dávka bude záviset na věku, hmotnosti a odpovědi konkrétního jedince. Výše uvedené dávky jsou příklady pro průměrné případy. Mohou se - samozřejmě - vyskytnou případy, ve kterých budou nutné vyšší nebo nižší dávky, a takové dávky spadají do rozsahu předkládaného vynálezu.

Dávka závisí na volbě peptidu, způsobu podání, charakteru prostředku, onemocnění a stavu jedince a na úvaze lékaře. Vhodné dávky jsou v rozmezí 0,1 - 100 μg/kg hmotnosti jedince.

Vakcinační prostředek je výhodně v injekční formě. Pro zesílení imunitní odpovědi mohou být použita běžná adjuvans. Vhodná dávka antigenu pro vakcinaci je 0,5-5 μg/kg a taková dávka je výhodně podána 1-3 v intervalu 1-3 týdny. Při uvedené

11.04.01

dávce nebyly při podání sloučenin podle předkládaného vynálezu pozorovány žádné nežádoucí toxické účinky, což umožňuje jejich podání jedincům.

Předpokládá se široké rozmezí možných dávek, z důvodů dostupnosti mnoha sloučenin a různé účinnosti při různých způsobech podání. Například, předpokládá se, že při orálním podání budou nutné vyšší dávky než při intravenosní injekci. Úpravy dávek mohou být provedeny za použití běžných způsobů pro optimalizaci dávek, jak jsou v oboru známé.

Databáze sekvencí, sekvence v konkrétním mediu a algoritmy

Polynukleotidové a polypeptidové sekvence tvoří hodnotný zdroj informací, který určuje jejich 2- a 3-rozměrné struktury, stejně jako identifikuje další sekvence s podobnou homologií. tyto postupy se nejlépe provádějí uložením sekvencí v počítačovém mediu a potom použitím uložených dat ve známých programech pro strukturu makromolekul nebo pro prohledávání databází sekvencí za použití známých nástrojů, jako je GCG program.

Vynález také poskytuje způsoby pro analýzu charakteru sekvencí nebo řetězců, zejména genetických sekvencí nebo kódovaných proteinových sekvencí. Mezi výhodné metody analýzy sekvence patří, například, metody analýzy homologie sekvencí, jako je analýza identity a podobnosti, analýza struktury DNA, RNA a proteinů, přiřazování sekvencí, kladistická analýza, analýza motivů sekvencí, určování otevřených čtecích rámců, vyhledávání bazí nukleových kyselin, analýza využití kodonů, odstraňování bazí nukleových kyselin a analýza chromatogramových píků pro sekvencován.

11.04.01

Počítačová metoda je poskytnuta pro identifikaci homologií. Tato metoda zahrnuje kroky: poskytnutí první polynukleotidové sekvence obsahující sekvenci polynukleotidu podle předkládaného vynálezu v počítačovém mediu; a srovnání uvedené první polynukleotidové sekvence s alespoň jednou druhou polynukleotidovou nebo polypeptidovou sekvencí pro identifikaci homologie.

Počítačová metoda je také poskytnuta pro identifikaci homologií. Tato metoda zahrnuje kroky: poskytnutí první polypeptidové sekvence obsahující sekvenci polypeptidu podle předkládaného vynálezu v počítačovém mediu; a srovnání uvedené první polypeptidové sekvence s alespoň jednou druhou polynukleotidovou nebo polypeptidovou sekvencí pro identifikaci homologie.

Všechny publikace a odkazy, včetně patentů a patentových přihlášek, citované v této přihlášce, jsou zde uvedeny jako odkazy ve své úplnosti. Jakákoliv patentová přihláška, vůči které nárokuje tato přihláška prioritu, je také uvedena jako odkaz ve své úplnosti.

Definice

termín "identita", jak je zde použit, označuje vztah mezi dvěma nebo více polypeptidovými sekvencemi nebo mezi dvěma nebo více polynukleotidovými sekvencemi, který je určený srovnáním sekvencí. Termín "identita" také označuje stupeň podobnosti sekvencí mezi polypeptidovými nebo polynukleotidovými sekvencemi, který je určen počtem shod mezi řetězci takových sekvencí. "Identita" může být vypočítána známými způsoby, včetně způsobů popsaných v (Computational

11.04.01

Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987; a Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; a Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J Applied Math., 48: 1073 (1988). Způsoby pro stanovení identity jsou navrýženy tak, aby dávaly největší shodu mezi testovanými sekvencemi. Kromě toho, způsoby pro stanovení identity jsou kodifikovány ve veřejně dostupných počítačových programech. Počítačovými programy pro určení identity mezi dvěma sekvencemi jsou, například, GAP program v PCG programu (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(1): 387 (1984)); BLASTP, BLASTN (Altschul, S.F. et al., J. Molec. Biol. 215: 403-410, (1990)); a FASTA (Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-2448 (1988)). BLAST rodina programů je dostupná od NCIB a z jiných zdrojů (BLAST Manual, Alschul, S. et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S.F. et al., J. Molec. Biol. 215: 403-410, (1990)). Pro stanovení identity může být také použit dobře známý Smith Watermanův algoritmus.

Parametry pro srovnání polypeptidových sekvencí jsou následující:

Algoritmus: Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970);

Srovnávací matrice: BLOSSUM62 od Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919 (1992);

Penále za mezeru: 8

11.04.01

Penále za délku mezery: 2

Program použitelný s těmito parametry je dostupný jako "gap" program od Genetics Computer Group, Madison, WI. Výše uvedené parametry jsou chybové parametry pro srovnávání peptidů (spolu s nulovým penále za koncové mezery).

Prametry pro srovnání polynukleotidů jsou následující:
Algoritmus: Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970);
Srovnávací matrice: shody = ++10, chybné páry = 0
Penále za mezeru: 50
Penále za délku mezery: 3
Dostupné jako: "gap" program od Genetics Computer Group, Madison, WI. Výše uvedené parametry jsou chybové parametry pro srovnávání nukleových kyselin.

Výhodné hodnoty pro "identitu" pro polynukleotidy a polypeptid jsou uvedeny pod (1) a (2), dále.

(1) Polynukleotidová provedení dále zahrnují izolovaný polynukleotid obsahující polynukleotidovou sekvenci mající alespoň 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 nebo 100% identitu s referenční sekvencí SEQ ID NO: 1, kde uvedená polynukleotidová sekvence může být identická s referenční sekvencí SEQ ID NO: 1 nebo může obsahovat určitý počet nukleotidových alterací ve srovnání s referenční sekvencí, kde uvedené alterace jsou vybrány ze skupiny zahrnující deleci, substituci, včetně transice a transverse, nebo inserci alespoň jednoho nukleotidu a kde uvedené alterace se mohou vyskytovat na 5' nebo 3' koncových pozicích referenčního nukleotidové sekvence nebo

kdekoliv mezi těmito dvěma konci referenční sekvence v jedné nebo více nepřerušovaných skupinách v referenční sekvenci, a kde uvedený počet nukleotidových alterací je stanoven vynásobením celkového počtu nukleotidů v SEQ ID NO: 1 číslem určujícím procento identity vyděleným 100 a potom odečtením výsledku od uvedeného celkového počtu nukleotidů v SEQ ID NO: 1, neboli:

$n_n \leq x_n - (x_n \bullet y)$,

kde n_n je počet nukleotidových alterací, x_n je celkový počet nukleotidů v SEQ ID NO: 1, y je 0,50 pro 50%, 0,60 pro 60%, 0,70 pro 70%, 0,80 pro 80%, 0,85 pro 85%, 0,90 pro 90=, 0,95 pro 95%, 0,97 pro 97% nebo 1,00 pro 100%, a • je symbol pro násobení, kde jakékoliv jiné než celé číslo výsledku x_n a y je zaokrouhleno dolů na nejbližší celé číslo před odečtením od x_n. Alterace polynukleotidové sekvence kódující polypeptid SEQ ID NO: 2 mohou vytvářet chybové, nesmyslné mutace nebo mutace způsobující posun čtecího rámce v této kódující sekvenci a proto mohou alterovat polypeptid kódovaný polynukleotid podle takových alterací.

Například, polynukleotidová sekvence podle předkládaného vynálezu může být identická s referenční sekvencí SEQ ID NO: 1, to znamená, že může být 100% identická nebo může obsahovat určitý počet alterací nukleové kyseliny vzhledem k referenční sekvenci, takže procento identity je menší než 100%. Takové alterace jsou vybrány ze skupiny zahrnující delece, substituce, včetně transice a transverse, nebo inserce alespoň jedné nukleové kyseliny a uvedené alterace se mohou vyskytovat na 5' nebo 3' koncových pozicích referenčního nukleotidové

11.04.01

sekvence nebo kdekoliv mezi těmito dvěma konci referenční sekvence, kde jsou buď jednotlivě mezi nukleovými kyselinami referenční sekvence, nebo v jedné nebo více nepřerušovaných skupinách v referenční sekvenci. Počet alterací nukleových kyselin je stanoven vynásobením celkového počtu nukleových kyselin v SEQ ID NO: 1 číslem určujícím procento identity vyděleným 100 a potom odečtením výsledku od uvedeného celkového počtu nukleových kyselin v SEQ ID NO: 1, neboli:

$n_n \leq x_n - (x_n \bullet y)$,

kde n_n je počet alterací nukleových kyselin, x_n je celkový počet nukleových kyselin v SEQ ID NO: 1, y je 0,70 pro 70%, 0,80 pro 80%, 0,85 pro 85% atd.; a • je symbol pro násobení, kde jakékoliv jiné než celé číslo výsledku x_n a y je zaokrouhleno dolů na nejbližší celé číslo před odečtením od x_n.

(1) Polypeptidová provedení dále zahrnují izolovaný polypeptid obsahující polypeptid mající alespoň 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 nebo 100% identitu s polypeptidovou referenční sekvencí SEQ ID NO: 2, kde uvedená polypeptidová sekvence může být identická s referenční sekvencí SEQ ID NO: 2 nebo může obsahovat určitý počet aminokyselinových alterací ve srovnání s referenční sekvencí, kde uvedené alterace jsou vybrány ze skupiny zahrnující deleci, substituci, včetně konzervativních a nekonzervativních substitucí, nebo inserci alespoň jedné aminokyseliny a kde uvedené alterace se mohou vyskytovat na amino- nebo karboxy- konci referenční polypeptidové sekvence nebo kdekoliv mezi těmito dvěma konci referenční sekvence, buď samostatně mezi aminokyselinami v referenční sekvenci, nebo v jedné nebo více nepřerušovaných skupinách v referenční

sekvenci, a kde uvedený počet aminokyselinových alterací je stanoven vynásobením celkového počtu aminokyselin v SEQ ID NO: 2 číslem určujícím procento identity vyděleným 100 a potom odečtením výsledku od uvedeného celkového počtu aminokyselin v SEQ ID NO: 2, neboli:

$n_a \leq x_a - (x_a \bullet y)$,

kde n_a je počet aminokyselinových alterací, x_a je celkový počet aminokyselin v SEQ ID NO: 2, y je 0,50 pro 50%, 0,60 pro 60%, 0,70 pro 70%, 0,80 pro 80%, 0,85 pro 85%, 0,90 pro 90=, 0,95 pro 95%, 0,97 pro 97% nebo 1,00 pro 100%, a • je symbol pro násobení, kde jakékoliv jiné než celé číslo výsledku x_a a y je zaokrouhleno dolů na nejbližší celé číslo před odečtením od x_a.

Například, polypeptidová sekvence podle předkládaného vynálezu může být identická s referenční sekvencí SEQ ID NO: 2, to znamená, že může být 100% identická nebo může obsahovat určitý počet aminokyselinových alterací vzhledem k referenční sekvenci, takže procento identity je menší než 100%. Takové alterace jsou vybrány ze skupiny zahrnující delece, substituce, včetně konzervativních a nekonzervativních substitucí, nebo inserce alespoň jedné aminokyseliny a uvedené alterace se mohou vyskytovat na karboxy- nebo amino- koncových pozicích referenční polypeptidové sekvence nebo kdekoliv mezi těmito dvěma konci referenční sekvence, kde jsou buď jednotlivě mezi aminokyselinami referenční sekvence, nebo v jedné nebo více nepřerušovaných skupinách v referenční sekvenci. Počet aminokyselinových alterací je stanoven vynásobením celkového počtu aminokyselin v SEQ ID NO: 2 číslem určujícím procento identity vyděleným 100 a potom odečtením

výsledku od uvedeného celkového počtu aminokyselin v SEQ ID NO: 2, neboli:

$n_a \leq x_a - (x_a \bullet y)$,

kde n_a je počet alterací nukleových kyselin, x_a je celkový počet nukleových kyselin v SEQ ID NO: 2, y je 0,70 pro 70%, 0,80 pro 80%, 0,85 pro 85% atd.; a • je symbol pro násobení, kde jakékoliv jiné než celé číslo výsledku x_a a y je zaokrouhleno dolů na nejbližší celé číslo před odečtením od x_a.

Termín „jedinec" použitý v souvislosti s organismem, označuje mnohobuněčný eukaryotický organismus, včetně, například, metazoan, savce, ovid, bovid, opice, primáta a člověka.

Termín "izolovaný" znamená odebraný "rukou člověka" z přirozeného stavu, t.j. pokud se vyskytuje v přírodě, tak změněný nebo odstraněný z původního prostředí, nebo oboje Například, polynukleotid nebo polypeptid přirozeně přítomný v živém organismu není "izolovaný", ale stejný polynukleotid nebo polypeptid separovaný od materiálů souvisejících s ním v přirozeném stavu je "izolovaný". Dále, polynukleotid nebo polypeptid, který je vložen do organismu transformací, genetickou manipulací nebo jakoukoliv jinou rekombinantní metodou, je "izolovaný", i když je přítomen v organismu, který může být živý nebo mrtvý.

Termín "polynukleotid" označuje polyribonukleotid nebo polydeoxyribonukleotid, kterým může být nemodifikované RNA nebo DNA nebo modifikovaná RNA nebo DNA včetně jedno- a dvouřetězcových regionů.

Termín "varianta" označuje polynukleotid nebo polypeptid, který se liší od referenčního polynukleotidu nebo polypeptidu, ale který si zachovává významné vlastnosti. Typická varianta polynukleotidu se liší v nukleotidové sekvenci od jiného, referenčního polynukleotidu. Změny nukleotidové sekvence varianty mohou, ale nemusí, měnit aminokyselinovou sekvenci polypeptidu kódovaného referenčním polynukleotidem. Nukleotidové změny mohou vést k aminokyselinovým substitucím, adicím, delecím, fúzím a zkrácením polypeptidu kódovaného referenční sekvencí, jak je uvedeno dále. Typické varianty polypeptidu se liší od jiného, referenčního polypeptidu. Obecně jsou odlišnosti omezeny, takže sekvence referenčního polypeptidu a varianty jsou blízce podobné a v mnoha regionech jsou identické. varianta a referenční polypeptid se mohou lišit v aminokyselinové sekvenci v jedné nebo více substitucích, adicích nebo delecích nebo kombinaci těchto změn. Substituovaný nebo insertovaný aminokyselinový zbytek může a nemusí být kódovaný genetickým kodem. Varianta polynukleotidu nebo polypeptidu může být přirozená varianta, jako je například alelická varianta, nebo se může jednat o variantu, která se přirozeně nevyskytuje. Přirozeně se nevyskytující varianty polynukleotidů a polypeptidů mohou být připraveny technikami mutagenese nebo přímou syntézou.

Termín "onemocnění" označuje jakékoliv onemocnění způsobené nebo související s infekcí bakteriemi, včetně, například, infekce horních cest dýchacích, invazivních bakteriálních onemocnění, jako je bakteriemie a meningitida.

Příklady provedení vynálezu

Příklady uvedené dále byly provedeny za použití standardních technik, které jsou dobře známé v oboru, pokud

11.04.01

není podrobně uvedeno jinak. Příklady jsou pouze ilustrativní a nijak neomezují rozsah předkládaného vynálezu.

Příklad 1: Stanovení a potvrzení DNA sekvence BASB030 genu ze dvou kmenů Neisseria meningitidis

A. BASB030 v Neisseria meningitidis seroskupiny B kmenu ATCC 13090.

BASB030 gen SEQ ID NO: 1 byl prvně objeven v Incyte PathoSeq databázi obsahující nestanovené genomové DNA sekvence Neisseria meningitidis kmenu ATCC 13090. Translace BASB030 polynukleotidové sekvence, uvedená v SEQ ID NO: 2, ukázala významnou podobnost (81% identitu v 758 aminokyselinách) s Neisseria gonorrhoeae PilQ zevním membránovým proteinem. Sekvence BASB030 genu byla dále potvrzena experimentálně. Pro tento účel byla extrahována genomová DNA z 10^{10} buněk Neisseria meningitidis (kmen ATCC13090) za použití QIAGEN kitu pro extrakci genomové DNA (Qiagen Gmbh) a 1 µg tohoto materiálu byl zpracován DNA amplifikací pomocí polymerazové řetězové reakce za použití primerů PilQ1 (5'- GGG G GCTAGC AA TAC CAA ACT GAC AAA AAT CAT TTC C-3') (SEQ ID NO: 7) obsahujícího vnitřní NheI místo (podtržené) a PilQ2 (5'-GGG G AAGCTT AT AGC GCA GGC TGT TGC CGG C-3') (SEQ ID NO: 8) obsahujícího vnitřní HindIII místo (podtržené). Tento PCR produkt se přečistil na gelu a provedlo se DNA sekvencování za použití Big Dye Cycle Sequencing kitu (Perkin Elmer) a ABI 373A/PRISM DNA sekvenátoru. DNA sekvencování bylo provedeno na obou řetězcích s redundancí 2 a kompletní sekvence byla sestavena za použití SeqMan programu DNASTAR Lasergene softwaru. Získaná DNA sekvence a odvozená polypeptidová sekvence jsou uvedeny v SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 4, v příslušném pořadí.

11.04.01

B. BASB030 v N. meningitidis seroskupiny B kmene H44/76

Sekvence BASB030 genu byla také určena pro jinou N. meningitidis seropskupiny B kmene H44/76. Pro tento účel byla genomová DNA extrahována z N. meningitidis kmene H44/76 za použití pokusných podmínek uvedených v příkladu 1. Tento materiál (1 μg) byl potom zpracován DNA amplifikací za použití polymerasové řetězové reakce za použití PilQ1 a PilQ2 specifických pro BASB030 gen. Získal se 2300 bp DNA fragment, trávil se NhI/HindIII restrikčními endonukleasami a insertoval se do příslušných míst pET-24b klonovacího/expresního vektoru (Novagen) za použití standardních technik molekulární biologie (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, druhá vydání, Ed.: Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Rekombinantní pET-24b/BASB030 se potom podrobil DNA sekvencování za použití Big Dyes kitu (Applied Biosystems) a analyzoval se na ABI 373/A DNA sekvenátoru za podmínek doporučených výrobcem. Takto byla získána polynukleotidová a odvozená polypeptidová sekvence, které jsiou zde označeny jako SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 6, v příslušném pořadí. Za použití MegALign programu z DNASTAR softwaru se provedlo přiřazení polynukleotidových sekvencí SEQ ID NO: 1,3 a 5 a toto přiřazení je uvedeno na obr. 1; párové srovnání identit je shrnuto v tabulce 1, která ukazuje, že tři BASB030 polynukleotidové genové sekvence jsou všechny podobné s identitou vyšší než 98,0%. Za použití stejného MegAlign programu se provedlo přiřazení polypeptidových sekvencí SEQ ID NO: 2,4 a 6 a toto přiřazení je uvedeno na obr. 2; párové srovnání identit je shrnuto v tabulce 2, která ukazuje, že tři BASB030 proteinové sekvence jsou všechny podobné s identitou vyšší než 95,0%.

Dohromady tato data ukazují na silnou konzervaci sekvence BASB030 genu mezi dvěma kmeny N. meningitidis seroskupiny B.

Tabulka 1: Párové srovnání identit BASB030 polynukleotidových sekvencí (v %)

	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 5
SEQ ID NO: 1	99,9	98,9
SEQ ID NO: 3		99,0

Tabulka 2: Párové srovnání identit BASB030 polypeptidových sekvencí (v %)

	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 6
SEQ ID NO: 2	97,4	96,9
SEQ ID NO: 4		99,3

Příklad 2: Exprese a přečištění rekombinantního BASB030 proteinu v E. coli

Konstrukce pET-24b/BASB030 klonovacího/expresního vektoru byla popsána v příkladu 1B. Tento vektor obsahuje BASB030 gen izolovaný z kmene H44/76 fúzovaný s řetězcem 6 histidinových zbytků, umístěný pod kontrolou silného bakteriofágového T7 promotoru genu 10. Pro expresní studie byl tento vektor vložen do Escherichia coli kmene Novablue (DE3) (Novagen), ve kterém je gen pro T7 polymerasu umístěn pod kontrolu isopropyl-β-D-thiogalaktosidasou (IPTG)-regulovatelného lac promotoru. Kapalné kultury (100 ml) Novablue (DE3) (pET-24b/BASB030) rekombinantního kmene E. coli se kultivovaly při 37 ^{0}C za třepání do té doby, než optická densita při 600 nm (OD600) dosáhla 0,6. V této době se přidala IPTG v konečné koncentraci 1 mM a kultivace pokračovala po dobu dalších 4 hodin. Kultura se potom odstředila při 10000 rpm a peleta se zmrazila při -20 ^{0}C na dobu nejméně 10 hodin. Po rozmrazení se peleta resuspendovala během 30 minut při 25 ^{0}C v pufru A (6M

11.04.01

guanidinhydrochlorid, 0,1 M NaH_2PO_4, 0,01 M Tris, pH 8,0), třikrát se protlačila jehlou a pročistila se odstředěním (20000 rpm, 15 minut). Vzorek se potom vnesl rychlostí 1 ml/min na Hitrap kolonu naplněnou Ni^{2+}, kolona se postupně promyla 40 ml pufru B (8 M močovina, 0,1 M NaH_2PO_4, 0,01 M Tris, pH 8,0), 40 ml pufru C (8 M močovina, 0,1 M NaH_2PO_4, 0,01 M Tris, pH 6,3). Rekombinantní protein BASB030/His6 se potom eluoval z kolony 30 ml pufru D (8 M močovina, 0,1 M NaH_2PO_4, 0,01 M Tris, pH 6,3) obsahujícím 500 mM imidazolu a odebíraly se 3 ml frakce. Jak je uvedeno na obr. 3, z kolony eluoval značně obohacený (čistota více než 90% při coomasie barvení) BASB030/His6 protein, migrující při 85 kDa (stanovená molekulová hmotnost). Tento polypeptid byl reaktivní s myší monoklonální protilátkou namířenou proti 5-histidinovému motivu (viz obr. 3, dráha 2). Kromě toho, denaturovaný, rekombinantní PilQ-His6 protein mohl být solubilizován v roztoku neobsahujícím močovinu. Pro tento účel byl denaturovaný PilQ-His6 obsažený v 8M močovině důkladně dialyzován (2 hodiny) proti pufru R (NaCl 150 mM, 10 mM NaH_2PO_4, arginin 0,5 M, pH 6,8) obsahujícím postupně 6M, 4M a 2M močoviny. Příslušný přípravek PilQ zůstával solubilní i po zmrazení a rozmrazení. Dohromady tato data naznačují, že BASB030 gen může být exprimován a přečištěn v rozpustné i v nerozpustné formě z (BASB030/His6) v E. coli.

Příklad 3: Imunizace myší BASB030 polypeptidy a stanovení protilátkové odpovědi na rekombinantní BASB030 polypeptid pomocí ELISA

Částečně přečištěný BASB030 byl injikován třikrát BALB/c myším ve dny 0, 14 a 28 (5 zvířat/skupinu). Tento přirozený BASB030 polypeptid byl získán přímo z N. meningitidis kmene B (od J. Tommassen). Zvířatům bylo podáno podkožně 5 µg (první

injekce) a 2 μg (druhá a třetí injekce) BASB030 polypeptidu připraveného v SBAS2 (SB62 emulse obsahující 5 μg MPL a 5 μg QS21 na dávku) nebo po adsorpci AlPO4 (s 5 μg MPL). Negativní kontrolní skupinou byly myši imunizované pouze SBAS2 přípravkem (bez BASB030 polypeptidu). Myším byla odebírána krev ve dny 28 (14 po II) a 35 (7 po III) pro detekci specifických anti-BASB030 protilátek. Specifické anti-BASB030 protilátky byly měřeny ELISA za použití částečně přečištěného rekombinantního BASB030 polypeptidu jako proteinu potaženého na mikrokapsle. Analýzy byly provedeny na souboru sér (od 5 myší) pouze po II (den 28).

Rozpoznávání BASB030 epitopů na rekombinantních prtoeinech, podle ELISA

Stručně, mikrotitrační plotny (Maxisorb, Nunc) se potáhly 100 μl roztoku rekombinantního BASB030 v koncentraci přibližně 0,5 μg/ml v PBS během 2 hodin při 37 ^{0}C. Potom se plotny promyly třikrát 300 μl 150 mM NaCl - 0,05% Tween 20. Potom se potáhly 100 μl PBS-0,3-kaseinem a provedla se inkubace po dobu 30 minut při teplotě okolí za třepání. Plotny se potom promyly znovu stejným způsobem před inkubací s protilátkami. Zvířesí séra se seriově dvojnásobně ředila v PBS-0,3% kaseinu-0,05% Tween 20 a vnesla se na mikroplotny 12 ředění od ředění 1/100) před inkubací při teplotě okolí po dobu 30 minut za třepání, před dalším stejným krokem promytí. Anti-myší Ig (králičí, Dakopatts E0413) konjugovaný na biotin se použil v ředění 1/2000 v PBS - 0,3% kaseinu - 0,05% Tween 20 pro detekci myších anti-BASB030 protilátek. Po posledním promývacím kroku (jak byl popsán výše) se plotny inkubovaly s roztokem komplexu streptavidin-peroxidasa ředěném 1/4000 ve stejném roztoku po dobu 30 minut při teplotě okolí za třepání.

11.04.01

Uvedené výsledky ukazují, že BASB030 polypeptid je vysoce imunogenní u BALB/c myší, jak v SBAS2 emulsy, tak po adsorpci na AlPO4/MPL (obr. 4). Tyto protilátky, indukované po pouze dvou injekcích přirozeného proteinu, rozpoznávají rekombinantní BASB030 polypeptid. Obr. ukazuje, že SBAS2 emulse je o něco málo méně imunogenní, než přípravek AlPO4/MPL. Přečištěný rekombinantní BASB030 polypeptid byl také injikován BALB/c myším pro hodnocení jeho imunogenicity.

Rozpoznávání BASB030 přirozených epitopů na buňkách, podle ELISA s celými buňkami

Homologický H44/76 MenB kmen (B:15:P1.7, 16) byl použit jako potažená bakterie pro detekci specifických anti-BASB030 protilátek ve zvířecím séru. Stručně, mikrotitrační plotny (Maxisorb, Nunc) se potáhly 100 µl roztoku H44/76 bakterií v ředění 1/10 (v PBS) z 6 hodinové kultury, ve které byly bakterie usmrceny 400 µg/ml tetracyklinu. Plotny se inkubovaly při 37 ^{0}C po dobu alespoň 16 hodin, dokud nebyly plotny zcela usušeny. Potom se plotny promyly třikrát 300 µl 150 mM NaCl - 0,05% Tween 20. Potom se potáhly 100 µl PBS-0,3-kaseinem a provedla se inkubace po dobu 30 minut při teplotě okolí za třepání. Plotny se potom promyly znovu stejným způsobem před inkubací s protilátkami. Zvířecí séra se seriově dvojnásobně ředila v PBS-0,3% kaseinu-0,05% Tween 20 a vnesla se na mikroplotny (12 ředění od ředění 1/100) před inkubací při teplotě okolí po dobu 30 minut za třepání, před dalším stejným krokem promytí. Anti-myší Ig (králičí, Dakopatts E0413) konjugovaný na biotin se použil v ředění 1/2000 v PBS - 0,3% kaseinu-0,05% Tween 20 pro detekci myších anti-BASB030 protilátek. Po posledním promývacím kroku (jak byl popsán výše) se plotny inkubovaly s roztokem komplexu streptavidin-

11.04.01

peroxidasa ředěném 1/4000 ve stejném roztoku po dobu 30 minut při teplotě okolí za třepání.

Jak je uvedeno na obr. 5, učinili jsme závěr, že existuje specifické rozpoznávání BASB030 antigenu na homologickém kmenu H44/76 u myší imunizovaných přečištěnou molekulou připravenou v SBAS2 emulsi, stejně jako v AlPO4/MPL adjuvans (byly analyzovány soubory 5 myší/skupinu). Antigenní odpověď je vyšší pro SBAS2 přípravek při použití rekombinantního BASB030 proteinu. Myši, kterým bylo podáno pouze adjuvans SBAS2, nevykazovaly jasnou pozitivní reakci.

Příklad 4: Přítomnost anti-BASB030 protilátek v séru od lidských pacientů v rekonvalescenci

V tomto testu byla lidská séra od pacientů v rekonvalescenci testována westernovým přenosem na přítomnost specifických protilátek, za použití přečištěného rekombinantního BASB030 proteinu, stejně jako přirozeného BASB030 proteinu (od J. Tommassen, Netherlands).

Stručně, 5 µg přečištěného BASB030 proteinu (rekombinantního nebo přirozeného) se vneslo do SDS-PAGE gradientového gelu (4-20%, Novex, kód n^0 EC60252) pro elektroforetickou migraci. Proteiny se přenesly na nitrocelulosové membrány (0,45 µm, BioRad, kód 162-0114) při 100 voltech během 1 hodiny za použití Bio-Rad Trans-blot systému (kód 170-3930). Potom se filtry blokovaly PBS-0,05% Tween 20 přes noc při teplotě okolí, před inkubací s lidským sérem. Tato séra se ředila 100-krát v PBS-0,05% Tween 20 a inkubovala se na nitrocelulosových membránách po dobu 2 hodin při teplotě okolí s jemným třepáním, za použití mini-blotter systému (Miniprotean, Bio-rad kód 170-4017). Po třech opakovaných promytích v PBS-0,05%

Tween 20 po dobu 5 minut se nitrocelulosová membrána inkubovala při teplotě okolí po dobu 1 hodiny za opatrného třepání s vhodným konjugátem (biotinylovanými anti-lidský IgG protilátkami, ovčími, Amersham, kód RPN1003, nebo biotinylovanými anti-myší Ig protilátkami, králičími, Amersham, kód RPN1001) ředěným 1/500 ve stejném promývacím pufru. Membrána se potom promyla třikrát způsobem popsaným výše a inkubovala se po dobu 30 minut za třepání s komplexem streptavidin-peroxidasa (Amersham, kód 1051) ředěným 1/1000 v promývacím pufru. Po posledních třech promytích došlo ke zobrazení během 10-15 minutové inkubace v 50 ml roztoku obsahujícího 30 mg 4-chlor-1-naftolu (Sigma), 10 ml methanolu, 40 ml PBS a 30 µl H_2O_2. Barvení se ukončilo promytím membrán několikrát v destilované vodě.

Výsledky uvedené na obr. 6 a 7 (část A) ukazují, že 5 až 7 ze 7 sér od pacientů v rekonvalescenci rozpoznává buď přirozený BASB030 protein různé molekulové hmotnosti (obr. 6) nebo rekombinantní BASB030 protein molekulové hmotnosti přibližně 90 kDa (obr. 7). Dvě rekonvalescentní séra, která reagovala slabě s rekombinantním BASB030 polypeptidem, jsou č. 261469 a č. 261979 (obr. 7), zatímco pro přirozený BASB030 polypeptid nevykazovala č. 262117 a 261979 žádnou zřetelnou reakci (obr. 6). Ta séra, která reagovala s nejvyšší intenzitou, jsou stejná pro oba proteiny (rekombinantní a přirozený). Tyto reakce mohou odrážet význam tohoto polypeptidy jako kandidáta pro vakcíny. Přirozený BASB030 protein se objevuje v alespoň třech různých proužcích, které patrně všechny náleží BASB030 polypeptidu, kde největší je identický na obou gelech (přibližně 90 kDa). Přirozený BASB030 polypeptid, přímo izolovaný z bakterií, má degradační produkty, které se znázornily jako proužky 45 a 35 kDa. V části B obou westernových přenosů je ilustrována reakce

11.04.01

myších protilátek proti homolognímu proteinu z Neisseria gonorrhoeae (J. Tommassen, The Netherland). Výsledky jasně ilustrují, že existuje zkřížená reaktivita mezi oběma homologickými BASB030 proteiny; pro rekombinantní BASB030 protein jsou detekovány dva hlavní proužky, kde jeden je hlavní proužek velikosti 90 kDa, který je rozpoznávaný lidských rekonvalescentním sérem, a druhý má velikost přibližně 70 kDa (obr. 7). Na přirozeném BASB030 proteinu rozpoznávají myší protilátky nejen pouze dva hlavní proužky v 90 a 45 kDa jako při použití rekonvalescentního séra, ale také proužek, který může být tvořen degradačními produkty (přibližně 75, 70, 55, 40, 35 a 25 kDa, viz obr. 6).

Příklad 5: Účinnost BASB030 vakcíny: aktivita anti-BASB030 protilátek

Baktericidní aktivita anti-BASB030 protilátek na homologní kmen N. meningitidis

Baktericidní aktivita zvířecího séra (souboru) byla testována způsobem popsaným dříve (1,2) s drobnými modifikacemi. Stručně, N. meningitidis seroskupiny B (kmen H44/76) se použila pro stanovení baktericidní aktivity živočišného séra. V U-jamkových 96-jamkových mikroplotnách (NUNC) se 50 µl/jamku seriového dvoujnásobného ředění inkubuje s 37,5 µl/jamku meningokokové suspenze v log fázi upravené na $2,5\ 10^4$ CFU/ml a provede se inkubace po dobu 15 minut při 37 ^{0}C za třepání při 210 rpm (Orbital shaker, Forma Scientifics). otom se přidá 12,5 µl králičího komplementu od mláďat (Pel freeze Biologicals, US) a provede se inkubace po dobu další 1 hodiny za stejných podmínek. Potom se 10 µl podíly směsi z každé jamky nanesou na Mueller-Hintonovi agarové plotny obsahující 1% Isovitalex a 1% teplem inaktivované koňské sérum a potom se provede inkubace přes noc při 37 ^{0}C s 5% CO_2. O den

později se spočítají kolonie pro každé testované ředění a baktericidní titry se určí jako ředění séra pro 50% usmrcování, ve srovnání s komplementovou kontrolou bez séra. Tímto způsobem mohou být jednotlivé kolonie počítány až do 100 CFU na skvrnu. Titry se vyjádří jako ředění indukující 50% zabíjení, jak se vypočítá regresní analýzou.

Výsledky ilustrované v tabulce 3 ukazují, že anti-BASB030 protilátky mají silný baktericidní efekt na homologický kmen H44/76, jak je také pozorováno pro anti-PorA monoklonální protilátku použitou jako pozitivní kontrola. Při ředění 1/2560 je procento zabíjení stále velmi vysoké (91%).

Odkazy:

1. Hoogerhout, P., Donders, E.M.L.M., van Graas-van den Brink, J.A:M., Kuipers, B., Brugge, H.F., van Unen L.M.A., Timmermans, H.A.M, ten Hove, G.J., de Jong, A.D.P.J.M, Peeters, C.C.A.M., Wiertz, E.J.H.J, a Poolman, J.T., Infection and Immunity, Sept. 1995, svazek 63, č. 9, str. 3473-3478.

2. Maslanka, S:E., Gheesling, L.L., Libutti, D.E., Donaldson, K.B., Harakeh, H.S., Dykes, J.K., Arhin, F.F., Devi, S.J.N., Frasch, C.E., Huang, J.C., Kriz-Kuzemenska, P., Lemmon, R.D., Lorange, M., Peeters, C.C.A.M., Quataert, S:, Tai, J.Y., Carlone, G.M., a the Multilaboratory Study Group, v Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1997, 4: 156-167.

11.04.01

Tabulka 3: Baktericidní efekt anti-BASB030 protilátek

Testované protilátky	Testovaná ředění	Získané zabíjení (%)
Anti-PorA monoklonální Ab (pozitivní kontrola)	1/10000	100
Anti-BASB030 polyklonální protilátky	1/40	96
	1/80	68
	1/160	56
	1/320	68
	1/640	56
	1/1280	96
	1/2560	91
Negativní kontrola	1/40	0

Příklad 6: Účinnost anti-BASB030 protilátek v modelu pasivní ochrany (mladé krysy)

Ani-BASB030 protilátky získané od imunizovaných myší (5/skupinu, dvě skupiny) byly hodnoceny na protektivní účinnost v protektivním modelu na mladých krysách. Test měřil rychlost eliminace N. meningitidis kmene B protilátkami injikovanými 24 hodin před infekcí.

Stručně, 100 µl 1/10 ředění myšího séra (se specifickými anti-BASB030 protilátkami) se injikuje intraperitoneálně (IP) 7-denním krysám (Sprague-Dawley) 24 hodin před infekcí živými bakteriemi (den -1). V den 0 se krysám, randomizovaným a pasivně imunizovaným myším sérem v den -1, po IP 10 mg dextranu železa ve 100 µl, 30 minut úřed IP podáním 10^7 živých bakterií (100 µl) jednoho nebo více kmenů N. meningitidis H44/76 (B"15:P1.7,16), předtím pasážovaných na krysách (dvakrát). Kmen N. meningitidis se nechá růst v kaplném TBS

11.04.01

mediu po dobu přibližně 2 hodin. Bakterie se potom ředí v PBS za zisku suspenze 1.10^8 CFU/ml. Pro tento test se použití krysy ve věku 7 dnů. Skupiny jsou složeny z 8 krys, které jsou náhodně vybrány z vrhů před tím, než se provede IP injekce 100 µl testovaných sér. Tři hodiny po infekci se 20 µl krve, získané srdeční punkcí v anestesii, ředí v PBS (1/10, 1/100, 1/1000 a 1/10000) a několik ředění se vnese do Mueller Hintonova media pro počítání jednotek vytvářejících kolonie (CFU). Potom (za 24 hodin) se hodnotí počet CFU a srovnává se s počtem CFU/ml krve u krys pasivně imunizovaných PBS. Kontrolní skupinou jsou krysy, kterým byl injikován PBS. Vážené průměry jsou vypočítány pro každé zvíře a průměr pro každou skupinu se srovnává s jiným průměrem.

Výsledky získané s anti-BASB030 protilátkami (viz obr. 8) ilustrují, že tyto specifické protilátky mají eliminační efekt na N. meningitidis kmene H44/76, ve srovnání s negativní kontrolní skupinou. Je pozorován rozdíl až 1 $\log_{10}$ ve prospěch anti-BASB030 protilátek, ve srovnání s nespecifickými protilátkami přítomnými u myší, kterým byl injikován pouze PBS. Protektivní efekt pozorovaný pro naše anti-BASB030 protilátky je stejný, jako efekt získaný při použití dobře charakterizované anti-PorA monoklonální protilátky (H44/29, anti-P1.16).

Legenda k obr. 3

V podstatě čisté (z více než 80%) frakce BASB030 proteinu byly získány na 4-20% gradientovém polyakrylamidovém gelu (NOVEX) za SDS-PAGE podmínek paralelně s proteinovým markerem molekulové hmotnosti. Gely byly buď barveny Coomasie Blue R250, nebo byly analyzovány westernovým přenosem za použití anti-(His5) monoklonální protilátky.

Uložené materiály

Depozitum obsahující kmen Neisseria meningitidis seroskupiny B bylo uloženo v American Type Culture Collection (zde "ATCC") 22.6.1997 a bylo označeno přírůstkovým číslem 13090. Depozitum bylo popsáno jako Neisseria meningitidis (Albrecht and Ghon) a jde lyofilizovanou, 1,5-2,9 kb insertovou knihovnu konstruovanou z izolátu N. meningitidis. Depozitum je popsáno v Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon. 8: 1-15 (1958).

Depozitum kmene Neisseria meningitidis je zde označováno jako "deponovaný kmen" nebo jako "DNA deponovaného kmene".

Deponovaný kmen obsahuje kompletní BASB030 gen. Sekvence polynukleotidů obsažených v deponovaném kmenu, stejně jako aminokyselinová sekvence jakéhokoli jím kódovaného polypeptidu, jsou kontrolní v jakémkoliv případě konfliktu s jakýmkoliv popisem sekvence v předkládaném vynálezu.

Uložení deponovaných kmenů bylo provedeno podle Budapešťské smlouvy o Mezinárodním ukládání mikroorganismů pro patentové postupy. Kmen bude neodvolatelně a bez omezení nebo podmínek uvolněn pro veřejnost po uplynutí patentu. Deponovaný kmen je uveden pouze pro potřeby odborníků v oboru a není přístupný, pokud není nutný pro udělení patentu, jako je nutné podle 35 U.S.C. § 112.

11.04.01

Seznam sekvencí

<110> Smith Kline Beecham Biologicals S.A

<120> Antigenní polypeptidy Neisseria meningitidis, příslušné polynukleotidy a protektivní protilátky

<130> BM45323

<160> 8

<170> FastSeq pro Windows, verze 3.0

<210> 1
<211> 2310
<212> DNA
<213> bakteriální

<400> 1

atgaatacca aactgacaaa aatcatttcc ggtctctttg tcgcaaccgc cgcctttcag 60
acagcatctg caggaaacat tacagacatc aaagtttcct ccctgcccaa caaacagaaa 120
atcgtcaaag tcagctttga caaagagatt gtcaacccga ccggcttcgt aacctcctca 180
ccggcccgca tcgccttgga ctttgaacaa accggcattt ccatggatca acaggtactc 240
gaatatgccg atcctctgtt gagcaaaatc agtgccgcac aaaacagcag ccgtgcgcgt 300
ctggttctga atctgaacaa accgggccaa tacaataccg aagtacgcgg gaacaaagtt 360
tggatattca ttaacgaatc ggacgatacc gtgtccgccc ccgcacgccc cgccgtaaaa 420
gccgcgcctg ccgcaccggc aaaacaacag ggctgccgca ccgtctacca agtccgcagt 480
atccgtatcc aaacccttta ccccggcaaa acaacagctg ccgcaccgtt taccgagtcc 540
gtagtatccg tatccgcacc gttcagcccg gcaaaacaac aggcggcggc atcagcaaaa 600
caacagacgg cagcaccagc aaaacaacag acggcagcac cagcaaaaca acaggcggca 660
gcaccagcaa aacaaaccaa tatcgatttc cgcaaagacg gcaaaaatgc cggcattatc 720
gaattggctg cattgggctt tgccgggcag cccgacatca gccaacagca cgaccacatc 780
atcgttacgc tgaaaaacca taccctgccg accacgctcc aacgcagttt ggatgtggca 840
gactttaaaa caccggttca aaaggttacg ctgaaacgcc tcaataacga cacccagctg 900
attatcacaa cagccggcaa ctgggaactc gtcaacaaat ccgccgcgcc cggatacttt 960
accttccaag tcctgccgaa aaaacaaaac ctcgagtcag gcggcgtgaa caatgcgccc 1020
aaaaccttca caggccggaa aatctccctt gacttccaag atgtcgaaat ccgcaccatc 1080
ctgcagattt tggcaaaaga atccgggatg aacattgttg ccagcgactc cgtcaacggc 1140
aaaatgaccc tctccctcaa agacgtacct tgggatcagg ctttggattt ggttatgcag 1200
gcacgcaacc tcgatatgcg ccaacaaggg aacatcgtca acatcgcgcc ccgcgacgag 1260
ctgcttgcca aagacaaagc cttcttacag gcggaaaaag acattgccga tctaggcgcg 1320

ctgtattcac aaaacttcca attgaaatac aaaaatgtgg aagaattccg cagcatcctg 1380
cgtttggaca atgccgacac aaccggaaac cgcaatacgc ttgtcagcgg caggggcagc 1440
gtgctgatcg atcccgccac caataccctg attgttaccg atacccgcag cgtcatcgaa 1500
aaattccgca aactgattga cgaattggac gtacccgcgc aacaagtgat gattgaggcg 1560
cgtatcgtcg aagcggcaga cggcttctcg cgcgatttgg gcgttaaatt cggcgcgaca 1620
ggcaagaaaa agctgaaaaa tgatacaagc gcattcggct ggggggtaaa ctccggcttc 1680
ggcggcgacg ataaatgggg ggccgaaacc aaaatcaacc tgccgattac cgctgccgca 1740
aacagcattt cgctggtgcg cgcgatttcc tccggtgcct tgaatttgga attgtccgca 1800
tccgaatcgc tttcaaaaac caaaacgctt gccaatccgc gcgtgctgac ccaaaaccgc 1860
aaagaggcca aaatcgaatc cggttacgaa attcctttca ccgtaacctc aatcgcgaac 1920
ggcggcagca gcacgaacac ggaactcaaa aaagccgtct tggggctgac cgttacgccg 1980
aacatcacgc ccgacggcca aatcattatg accgtcaaaa tcaacaagga ctcgcctgcg 2040
caatgtgcct ccggtaatca gacgatcctg tgtatttcga ccaaaaacct gaatacgcag 2100
gctatggttg aaaacggcgg cacattgatt gtcggcggta tttatgaaga agacaacggc 2160
aatacgctga ccaaagtccc cctgttgggc gacatccccg ttatcggcaa cctctttaaa 2220
acacgcggga aaaaaaccga ccgccgcgaa ctgctgattt tcattacccc gaggattatg 2280
ggtacggccg gcaacagcct gcgctattga 2310

<210> 2
<211> 769
<212> PRT
<213>bakteriální

<400> 2

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

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

Ala Asp Thr Thr Gly Asn Arg Asn Thr Leu Val Ser Gly Arg Gly Ser
465 470 475 480
Val Leu Ile Asp Pro Ala Thr Asn Thr Leu Ile Val Thr Asp Thr Arg
485 490 495
Ser Val Ile Glu Lys Phe Arg Lys Leu Ile Asp Glu Leu Asp Val Pro
500 505 510
Ala Gln Gln Val Met Ile Glu Ala Arg Ile Val Glu Ala Ala Asp Gly
515 520 525
Phe Ser Arg Asp Leu Gly Val Lys Phe Gly Ala Thr Gly Lys Lys Lys
530 535 540
Leu Lys Asn Asp Thr Ser Ala Phe Gly Trp Gly Val Asn Ser Gly Phe
545 550 555 560
Gly Gly Asp Asp Lys Trp Gly Ala Glu Thr Lys Ile Asn Leu Pro Ile
565 570 575
Thr Ala Ala Ala Asn Ser Ile Ser Leu Val Arg Ala Ile Ser Ser Gly
580 585 590
Ala Leu Asn Leu Glu Leu Ser Ala Ser Glu Ser Leu Ser Lys Thr Lys
595 600 605
Thr Leu Ala Asn Pro Arg Val Leu Thr Gln Asn Arg Lys Glu Ala Lys
610 615 620
Ile Glu Ser Gly Tyr Glu Ile Pro Phe Thr Val Thr Ser Ile Ala Asn
625 630 635 640
Gly Gly Ser Ser Thr Asn Thr Glu Leu Lys Lys Ala Val Leu Gly Leu
645 650 655
Thr Val Thr Pro Asn Ile Thr Pro Asp Gly Gln Ile Ile Met Thr Val
660 665 670
Lys Ile Asn Lys Asp Ser Pro Ala Gln Cys Ala Ser Gly Asn Gln Thr
675 680 685
Ile Leu Cys Ile Ser Thr Lys Asn Leu Asn Thr Gln Ala Met Val Glu
690 695 700
Asn Gly Gly Thr Leu Ile Val Gly Gly Ile Tyr Glu Glu Asp Asn Gly
705 710 715 720
Asn Thr Leu Thr Lys Val Pro Leu Leu Gly Asp Ile Pro Val Ile Gly
725 730 735
Asn Leu Phe Lys Thr Arg Gly Lys Lys Thr Asp Arg Arg Glu Leu Leu
740 745 750
Ile Phe Ile Thr Pro Arg Ile Met Gly Thr Ala Gly Asn Ser Leu Arg
755 760 765
Tyr

11.04.01

<210> 3
<211> 2310
<212> DNA
<213> bakteriální

<400> 3

atgaatacca aactgacaaa aatcatttcc ggtctctttg tcgcaaccgc cgcctttcag 60
acagcatctg caggaaacat tacagacatc aaagtttcct ccctgcccaa caaacagaaa 120
atcgtcaaag tcagctttga caaagagatt gtcaacccga ccggcttcgt aacctcctca 180
ccggcccgca tcgccttgga ctttgaacaa accggcattt ccatggatca acaggtactc 240
gaatatgccg atcctctgtt gagcaaaatc agtgccgcac aaaacagcag ccgtgcgcgt 300
ctggttctga atctgaacaa accgggccaa tacaataccg aagtacgcgg gaacaaagtt 360
tggatattca ttaacgaatc ggacgatacc gtgtccgccc ccgcacgccc cgccgtaaaa 420
gccgcgcctg ccgcaccggc aaaacaacag gctgccgcac cgtctaccaa gtccgcagta 480
tccgtatcca aacccctttac cccggcaaaa caacaggctg ccgcaccgtt taccgagtcc 540
gtagtatccg tatccgcacc gttcagcccg gcaaaacaac aggcggcggc atcagcaaaa 600
caacagacgg cagcaccagc aaaacaacag acggcagcac cagcaaaaca acaggcggca 660
gcaccagcaa aacaaaccaa tatcgatttc cgcaaagacg gcaaaaatgc cggcattatc 720
gaattggctg cattgggctt tgccgggcag cccgacatca gccaacagca cgaccacatc 780
atcgttacgc tgaaaaacca taccctgccg accacgctcc aacgcagttt ggatgtggca 840
gactttaaaa caccggttca aaaggttacg ctgaaacgcc tcaataacga cacccagctg 900
attatcacaa cagccggcaa ctgggaactc gtcaacaaat ccgccgcgcc cggatacttt 960
accttccaag tcctgccgaa aaaacaaaac ctcgagtcag gcggcgtgaa caatgcgccc 1020
aaaaccttca caggccggaa aatctccctt gacttccaag atgtcgaaat ccgcaccatc 1080
ctgcagattt tggcaaaaga atccgggatg aacattgttg ccagcgactc cgtcaacggc 1140
aaaatgaccc tctccctcaa agacgtacct tgggatcagg ctttggattt ggttatgcag 1200
gcacgcaacc tcgatatgcg ccaacaaggg aacatcgtca acatcgcgcc ccgcgacgag 1260
ctgcttgcca aagacaaagc cttcttacag gcggaaaaag acattgccga tctaggcgcg 1320
ctgtattcac aaaacttcca attgaaatac aaaaatgtgg aagaattccg cagcatcctg 1380
cgtttggaca atgccgacac aaccggaaac cgcaatacgc ttgtcagcgg caggggcagc 1440
gtgctgatcg atcccgccac caataccctg attgttaccg atacccgcag cgtcatcgaa 1500
aaattccgca aactgattga cgaattggac gtacccgcgc aacaagtgat gattgaggcg 1560
cgtatcgtcg aagcggcaga cggcttctcg cgcgatttgg gcgttaaatt cggcgcgaca 1620
ggcaagaaaa agctgaaaaa tgatacaagc gcattcggct ggggggtaaa ctccggcttc 1680
ggcggcgacg ataaatgggg ggccgaaacc aaaatcaacc tgccgattac cgctgccgca 1740
aacagcattt cgctggtgcg cgcgatttcc tccggtgcct tgaatttgga attgtccgca 1800
tccgaatcgc tttcaaaaac caaaacgctt gccaatccgc gcgtgctgac ccaaaaccgc 1860
aaagaggcca aaatcgaatc cggttacgaa attcctttca ccgtaacctc aatcgcgaac 1920
ggcggcagca gcacgaacac ggaactcaaa aaagccgtct tggggctgac cgttacgccg 1980
aacatcacgc ccgacggcca aatcattatg accgtcaaaa tcaacaagga ctcgcctgcg 2040
caatgtgcct ccggtaatca gacgatcctg tgtatttcga ccaaaaacct gaatacgcag 2100

gctatggttg aaaacggcgg cacattgatt gtcggcggta tttatgaaga agacaacggc 2160
aatacgctga ccaaagtccc cctgttgggc gacatccccg ttatcggcaa. cctctttaaa 2220
acacgcggga aaaaaaccga ccgccgcgaa ctgctgattt tcattacccc gaggattatg 2280
ggtacggccg gcaacagcct gcgctattga 2310

<210> 4
<211> 769
<212> PRT
<213> bakteriální

<400> 4

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

Glu Leu Ala Ala Leu Gly Phe Ala Gly Gln Pro Asp Ile Ser Gln Gln
245 250 255
His Asp His Ile Ile Val Thr Leu Lys Asn His Thr Leu Pro Thr Thr
260 265 270
Leu Gln Arg Ser Leu Asp Val Ala Asp Phe Lys Thr Pro Val Gln Lys
275 280 285
Val Thr Leu Lys Arg Leu Asn Asn Asp Thr Gln Leu Ile Ile Thr Thr
290 295 300
Ala Gly Asn Trp Glu Leu Val Asn Lys Ser Ala Ala Pro Gly Tyr Phe
305 310 315 320
Thr Phe Gln Val Leu Pro Lys Lys Gln Asn Leu Glu Ser Gly Gly Val
325 330 335
Asn Asn Ala Pro Lys Thr Phe Thr Gly Arg Lys Ile Ser Leu Asp Phe
340 345 350
Gln Asp Val Glu Ile Arg Thr Ile Leu Gln Ile Leu Ala Lys Glu Ser
355 360 365
Gly Met Asn Ile Val Ala Ser Asp Ser Val Asn Gly Lys Met Thr Leu
370 375 380
Ser Leu Lys Asp Val Pro Trp Asp Gln Ala Leu Asp Leu Val Met Gln
385 390 395 400
Ala Arg Asn Leu Asp Met Arg Gln Gln Gly Asn Ile Val Asn Ile Ala
405 410 415
Pro Arg Asp Glu Leu Leu Ala Lys Asp Lys Ala Phe Leu Gln Ala Glu
420 425 430
Lys Asp Ile Ala Asp Leu Gly Ala Leu Tyr Ser Gln Asn Phe Gln Leu
435 440 445
Lys Tyr Lys Asn Val Glu Glu Phe Arg Ser Ile Leu Arg Leu Asp Asn
450 455 460
Ala Asp Thr Thr Gly Asn Arg Asn Thr Leu Val Ser Gly Arg Gly Ser
465 470 475 480
Val Leu Ile Asp Pro Ala Thr Asn Thr Leu Ile Val Thr Asp Thr Arg
485 490 495
Ser Val Ile Glu Lys Phe Arg Lys Leu Ile Asp Glu Leu Asp Val Pro
500 505 510
Ala Gln Gln Val Met Ile Glu Ala Arg Ile Val Glu Ala Ala Asp Gly
515 520 525
Phe Ser Arg Asp Leu Gly Val Lys Phe Gly Ala Thr Gly Lys Lys Lys
530 535 540
Leu Lys Asn Asp Thr Ser Ala Phe Gly Trp Gly Val Asn Ser Gly Phe
545 550 555 560
Gly Gly Asp Asp Lys Trp Gly Ala Glu Thr Lys Ile Asn Leu Pro Ile

```
                565                 570                 575
Thr Ala Ala Ala Asn Ser Ile Ser Leu Val Arg Ala Ile Ser Ser Gly
            580                 585                 590
Ala Leu Asn Leu Glu Leu Ser Ala Ser Glu Ser Leu Ser Lys Thr Lys
        595                 600                 605
Thr Leu Ala Asn Pro Arg Val Leu Thr Gln Asn Arg Lys Glu Ala Lys
    610                 615                 620
Ile Glu Ser Gly Tyr Glu Ile Pro Phe Thr Val Thr Ser Ile Ala Asn
625                 630                 635                 640
Gly Gly Ser Ser Thr Asn Thr Glu Leu Lys Lys Ala Val Leu Gly Leu
                645                 650                 655
Thr Val Thr Pro Asn Ile Thr Pro Asp Gly Gln Ile Ile Met Thr Val
            660                 665                 670
Lys Ile Asn Lys Asp Ser Pro Ala Gln Cys Ala Ser Gly Asn Gln Thr
        675                 680                 685
Ile Leu Cys Ile Ser Thr Lys Asn Leu Asn Thr Gln Ala Met Val Glu
    690                 695                 700
Asn Gly Gly Thr Leu Ile Val Gly Gly Ile Tyr Glu Glu Asp Asn Gly
705                 710                 715                 720
Asn Thr Leu Thr Lys Val Pro Leu Leu Gly Asp Ile Pro Val Ile Gly
                725                 730                 735
Asn Leu Phe Lys Thr Arg Gly Lys Lys Thr Asp Arg Arg Glu Leu Leu
            740                 745                 750
Ile Phe Ile Thr Pro Arg Ile Met Gly Thr Ala Gly Asn Ser Leu Arg
        755                 760                 765
Tyr
```

<210> 5
<211> 2310
<212> DNA
<213> bakteriální

<400> 5

```
atgaatacca aactgacaaa aatcatttcc ggtctctttg tcgcaaccgc cgcctttcag      60
acagcatcgg caggaaacat tacagacatc aaagtttcct ccctgcccaa caaacagaaa     120
atcgtcaaag tcagctttga caaagagatt gtcaacccga ccggcttcgt aacctcctca     180
ccggcccgca tcgccttgga ctttgaacaa accggcattt ccatggatca acaggtactc     240
gaatatgccg atcctctgtt gagcaaaatc agtgccgcac aaaacagcag ccgtgcgcgt     300
ctggttctga atctgaacaa accgggccaa tacaataccg aagtacgcgg gaacaaagtt     360
tggatattca ttaacgaatc ggacgatacc gtgtccgccc ccgcacgccc cgccgtaaaa     420
```

gccgcgcctg ccgcaccggc aaaacaacag gctgccgcac cgtctaccaa gtccgcagta 480
tccgtatccg aacccttttac cccggcaaaa caacaggctg ccgcaccgtt taccgagtcc 540
gtagtatccg tatccgcacc gttcagcccg gcaaaacaac aggcggcggc atcagcaaaa 600
caacaggcgg cagcaccagc aaaacaacag gcggcagcac cagcaaaaca acaggcggca 660
gcaccagcaa aacaaaccaa tatcgatttc cgcaaagacg gcaaaaatgc cggcattatc 720
gaattggctg cattgggctt tgccgggcag cccgacatca gccaacagca cgaccacatc 780
atcgttacgc tgaaaaacca taccctgccg accacgctcc aacgcagttt ggatgtggca 840
gactttaaaa caccggttca aaaggttacg ctgaaacgcc tcaataacga cacccagctg 900
attatcacaa cagccggcaa ctgggaactc gtcaacaaat ccgccgcgcc cggatacttt 960
accttccaag tcctgccgaa aaaacaaaac ctcgagtcag gcggcgtgaa caatgcgccc 1020
aaaaccttca caggccggaa aatctccctt gacttccaag atgtcgaaat ccgcaccatc 1080
ctgcagattt tggcaaaaga atccggaatg aacattgttg ccagcgactc cgtcaacggc 1140
aaaatgaccc tctccctcaa ggatgtgcct tgggatcagg ctttggattt ggttatgcag 1200
gcgcgcaacc tcgatatgcg ccagcaaggg aatatcgtca acatcgcgcc ccgcgacgag 1260
ctgcttgcca aagacaaagc cctcttacag gcagaaaaag acattgccga tttgggtgcg 1320
ctgtattccc aaaacttcca gttgaaatac aaaaatgtgg aagaattccg cagcatcctg 1380
cgtttggaca atgccgacac gaccggaaac cgcaacacgc ttatcagcgg caggggcagc 1440
gtgctgatcg atcccgccac caacaccctg attgttaccg acacccgcag cgtcatcgaa 1500
aaattccgca aactgattga cgaattggac gtacccgcgc aacaagtgat gattgaggcg 1560
cgtatcgtcg aagcggcaga cggcttctcg cgcgatttgg gcgttaaatt cggcgcgaca 1620
ggcaagaaaa agctgaaaaa tgatacaagc gcattcggct gggggggtaaa ctccggcttc 1680
ggcggcgacg ataaatgggg ggccgaaacc aaaatcaacc tgccgattac cgctgccgca 1740
aacagcattt cgctggtgcg cgcgatttcc tccggtgcct tgaatttgga attgtccgca 1800
tccgaatcgc tttcaaaaac caaaacgctt gccaatccgc gcgtgctgac ccaaaaccgc 1860
aaagaggcca aaatcgaatc cggttacgaa attcctttca ccgtaacctc aatcgcgaac 1920
ggcggcagca gcacgaacac ggaactcaaa aaagccgtct tggggctgac cgttacgccg 1980
aacatcacgc ccgacggcca aatcattatg accgtcaaaa tcaacaagga ctcgcctgcg 2040
caatgtgcct ccggtaatca gacgatcctg tgtatttcga ccaaaaacct gaatacgcag 2100
gctatggttg aaaacggcgg cacattgatt gtcggcggta tttatgaaga agacaacggc 2160
aatacgctga ccaaagtccc cctgttgggc gacatccccg ttatcggcaa cctctttaaa 2220
acacgcggga aaaaaaccga ccgccgcgaa ctgctgattt tcattacccc gaggattatg 2280
ggtacggccg gcaacagcct gcgctattga 2310

<210> 6
<211> 769
<212> PRT
<213> bakteriální

<400> 6

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

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

340 345 350

Gln Asp Val Glu Ile Arg Thr Ile Leu Gln Ile Leu Ala Lys Glu Ser

355 360 365

Gly Met Asn Ile Val Ala Ser Asp Ser Val Asn Gly Lys Met Thr Leu

370 375 380

Ser Leu Lys Asp Val Pro Trp Asp Gln Ala Leu Asp Leu Val Met Gln

385 390 395 400

Ala Arg Asn Leu Asp Met Arg Gln Gln Gly Asn Ile Val Asn Ile Ala

405 410 415

Pro Arg Asp Glu Leu Leu Ala Lys Asp Lys Ala Leu Leu Gln Ala Glu

420 425 430

Lys Asp Ile Ala Asp Leu Gly Ala Leu Tyr Ser Gln Asn Phe Gln Leu

435 440 445

Lys Tyr Lys Asn Val Glu Glu Phe Arg Ser Ile Leu Arg Leu Asp Asn

450 455 460

Ala Asp Thr Thr Gly Asn Arg Asn Thr Leu Ile Ser Gly Arg Gly Ser

465 470 475 480

Val Leu Ile Asp Pro Ala Thr Asn Thr Leu Ile Val Thr Asp Thr Arg

485 490 495

Ser Val Ile Glu Lys Phe Arg Lys Leu Ile Asp Glu Leu Asp Val Pro

500 505 510

Ala Gln Gln Val Met Ile Glu Ala Arg Ile Val Glu Ala Ala Asp Gly

515 520 525

Phe Ser Arg Asp Leu Gly Val Lys Phe Gly Ala Thr Gly Lys Lys Lys

530 535 540

Leu Lys Asn Asp Thr Ser Ala Phe Gly Trp Gly Val Asn Ser Gly Phe

545 550 555 560

Gly Gly Asp Asp Lys Trp Gly Ala Glu Thr Lys Ile Asn Leu Pro Ile

565 570 575

Thr Ala Ala Ala Asn Ser Ile Ser Leu Val Arg Ala Ile Ser Ser Gly

580 585 590

Ala Leu Asn Leu Glu Leu Ser Ala Ser Glu Ser Leu Ser Lys Thr Lys

595 600 605

Thr Leu Ala Asn Pro Arg Val Leu Thr Gln Asn Arg Lys Glu Ala Lys

610 615 620

Ile Glu Ser Gly Tyr Glu Ile Pro Phe Thr Val Thr Ser Ile Ala Asn

625 630 635 640

Gly Gly Ser Ser Thr Asn Thr Glu Leu Lys Lys Ala Val Leu Gly Leu

645 650 655

Thr Val Thr Pro Asn Ile Thr Pro Asp Gly Gln Ile Ile Met Thr Val

660 665 670

11.04.01

Lys Ile Asn Lys Asp Ser Pro Ala Gln Cys Ala Ser Gly Asn Gln Thr
675 680 685
Ile Leu Cys Ile Ser Thr Lys Asn Leu Asn Thr Gln Ala Met Val Glu
690 695 700
Asn Gly Gly Thr Leu Ile Val Gly Gly Ile Tyr Glu Glu Asp Asn Gly
705 710 715 720
Asn Thr Leu Thr Lys Val Pro Leu Leu Gly Asp Ile Pro Val Ile Gly
725 730 735
Asn Leu Phe Lys Thr Arg Gly Lys Lys Thr Asp Arg Arg Glu Leu Leu
740 745 750
Ile Phe Ile Thr Pro Arg Ile Met Gly Thr Ala Gly Asn Ser Leu Arg
755 760 765
Tyr

<210> 7
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificiální sekvence

<220>
<223> Primer

<400> 7
gggggctagc aataccaaac tgacaaaaat catttcc 37

<210> 8
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificiální sekvence

<220>
<223> Primer

<400> 8
ggggaagctt atagcgcagg ctgttgccgg c 31

11.04.01
PV 2000-4395
V4991

Patentové nároky

1. Izolovaný polypeptid obsahující aminokyselinovou sekvenci, která má alespoň 90% identitu s aminokyselinovou sekvencí vybranou ze skupiny zahrnující SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 6 v celé délce SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 6, v příslušném pořadí.

2. Izolovaný polypeptid podle nároku 1, ve kterém má aminokyselinová sekvence alespoň 95% identitu s aminokyselinovou sekvencí vybranou ze skupiny zahrnující SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 6 v celé délce SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 6, v příslušném pořadí.

3. Polypeptid podle nároku 1 obsahující aminokyselinovou sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 6.

4. Izolovaný polypeptid obsahující aminokyselinovou sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 6.

5. Izolovaný polypeptid mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 2.

6. Imunogenní fragment polypeptidu podle jakéhokoliv z nároků 1 až 5, kde uvedený imunogenní fragment může vyvolat imunitní odpověď (pokud je to nutné, tak po navázání na nosič), která rozpoznává polypeptid SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 nebo SEQ ID NO: 6.

7. Polypeptid podle jakéhokoliv z nároků 1 až 6, kde uvedený polypeptid je součástí většího fúzního proteinu.

11.04.01

8. Izolovaný polynukleotid kódující polypeptid podle jakéhokoliv z nároků 1 až 7.

9. Izolovaný polynukleotid obsahující nukleotidovou sekvenci kódující polypeptid, který má alespoň 90% identitu s aminokyselinovou sekvencí vybranou ze skupiny zahrnující SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 6 v celé délce SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 6, v příslušném pořadí, nebo nukleotidovou sekvenci komplementární k uvedenému izolovanému polynukleotidu.

10. Izolovaný polynukleotid obsahující nukleotidovou sekvenci, která má alespoň 90% identitu s nukleotidovou sekvencí kódující polypeptid SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 6 v celé délce kódujícího regionu, nebo nukleotidovou sekvenci komplementární k uvedenému izolovanému polynukleotidu.

11. Izolovaný polynukleotid obsahující nukleotidovou sekvenci, která má alespoň 97% identitu se SEQ ID NO: 3 nebo 5 v celé délce SEQ ID NO: 3 nebo 5, v příslušném pořadí, nebo nukleotidovou sekvenci komplementární k uvedenému izolovanému polynukleotidu.

12. Izolovaný polynukleotid podle jakéhokoliv z nároků 8 až 11, ve kterém je identita alespoň 99% k SEQ ID NO: 3 nebo 5.

13. Izolovaný polynukleotid obsahující nukleotidovou sekvenci kódující polypeptid SEQ ID NO: 4 nebo SEQ ID NO: 6.

14. Izolovaný polynukleotid obsahující polynukleotid SEQ ID NO: 3 nebo SEQ ID NO: 5.

15. Izolovaný polynukleotid obsahující nukleotidovou sekvenci kódující polypeptid SEQ ID NO: 4 nebo SEQ ID NO: 6, který je

11.04.01

možno získat vyšetřováním vhodné knihovny za přísných hybridizačních podmínek značenou sondou mající sekvenci SEQ ID NO: 3 nebo SEQ ID NO: 5 nebo fragmentu uvedených sekvencí.

16. Izolovaný polynukleotid obsahující nukleotidovou sekvenci kódující polypeptid SEQ ID NO: 2.

17. Izolovaný polynukleotid obsahující polynukleotid SEQ ID NO: 1.

18. Izolovaný polynukleotid obsahující nukleotidovou sekvenci kódující polypeptid SEQ ID NO: 2, který je možno získat vyšetřováním vhodné knihovny za přísných hybridizačních podmínek značenou sondou mající sekvenci SEQ ID NO: 1 nebo fragmentu uvedené sekvence.

19. Expresní vektor nebo rekombinantní živý mikroorganismus obsahující izolovaný polynukleotid podle jakéhokoliv z nároků 8-18.

20. Hostitelská buňka obsahující expresní vektor podle nároku 19 exprimující izolovaný polypeptid obsahující aminokyselinovou sekvenci, která má alespoň 90% identitu s aminokyselinovou sekvencí vybranou ze skupiny zahrnující SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 6, nebo membrána hostitelské buňky obsahující exprimovaný polypeptid.

21. Způsob produkce polypeptidu obsahujícího aminokyselinovou sekvenci, která má alespoň 90% identitu s aminokyselinovou sekvencí vybranou ze skupiny zahrnující SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje kultivaci hostitelské buňky podle nároku 20 za podmínek

11.04.01

vhodných pro produkci uvedeného polypeptidu a získání polypeptidu z kultivačního media.

22. Způsob pro expresi polynukleotidu podle jakéhokoliv z nároků 8-18 v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje transformaci hostitelské buňky expresním vektorem obsahujícím alespoň jeden uvedený polynukleotid a kultivaci uvedené hostitelské buňky za podmínek dostatečných pro expresi jakéhokoliv uvedeného polynukleotidu.

23. Vakcinační prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje účinné množství polypeptidu podle jakéhokoliv z nároků 1 až 7 a farmaceuticky přijatelný nosič.

24. Vakcinační prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje účinné množství polynukleotidu podle jakéhokoliv z nároků 8 až 18 a farmaceuticky přijatelný nosič.

25. Vakcinační prostředek podle jakéhokoliv z nároků 23 nebo 24 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený prostředek obsahuje alespoň jeden další antigen Neisseria meningitidis.

26. Protilátka imunospecifická pro polypeptid nebo imunologický fragment podle jakéhokoliv z nároků 1 až 7.

27. Způsob pro diagnostiku infekce Neisseria meningitidis v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje identifikaci polypeptidu podle jakéhokoliv z nároků 1 - 7, nebo protilátky, která je imunospecifická pro uvedený polypeptid, přítomné v biologickém vzorku od živočicha, u kterého je podezření na takovou infekci.

11.04.01

28. Použití prostředku obsahujícího imunologicky účinné množství polypeptidu podle jakéhokoliv z nároků 1-7 pro přípravu léku pro použití pro vyvolání imunitní reakce u zvířete.

29. Použití prostředku obsahujícího imunologicky účinné množství polynukleotidu podle jakéhokoliv z nároků 8-18 pro přípravu léku pro použití pro vyvolání imunitní reakce u zvířete.

30. Terapeutický prostředek použitelný pro léčbu lidí s onemocněním způsobeným Neisseria meningitidis v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje alespoň jednu protilátku namířenou proti polypeptidu podle jakéhokoliv z nároků 1-7 a vhodný farmaceutický nosič.

11.04.01
PV2000-4395
17991

Obr. 1: Přiřazení BASB030 polynukleotidových sekvencí.

Identita se SEQ ID NO: 1 je znázorněna tečkou a pomlčka ("-") znázorňuje chybějící nukleotid

```
                    *         20          *         40          *
Seqid1 : ATGAATACCAAACTGACAAAAATCATTTCCGGTCTCTTTGTCGCAACCGC :   50
Seqid3 : .................................................. :   50
Seqid5 : .................................................. :   50

                   60          *         80          *        100
Seqid1 : CGCCTTTCAGACAGCATCTGCAGGAAACATTACAGACATCAAAGTTTCCT :  100
Seqid3 : .................................................. :  100
Seqid5 : .................G................................ :  100

                    *        120          *        140          *
Seqid1 : CCCTGCCCAACAAACAGAAAATCGTCAAAGTCAGCTTTGACAAAGAGATT :  150
Seqid3 : .................................................. :  150
Seqid5 : .................................................. :  150

                   160          *        180          *        200
Seqid1 : GTCAACCCGACCGGCTTCGTAACCTCCTCACCGGCCCGCATCGCCTTGGA :  200
Seqid3 : .................................................. :  200
Seqid5 : .................................................. :  200

                    *        220          *        240          *
Seqid1 : CTTTGAACAAACCGGCATTTCCATGGATCAACAGGTACTCGAATATGCCG :  250
Seqid3 : .................................................. :  250
Seqid5 : .................................................. :  250

                   260          *        280          *        300
Seqid1 : ATCCTCTGTTGAGCAAAATCAGTGCCGCACAAAACAGCAGCCGTGCGCGT :  300
Seqid3 : .................................................. :  300
Seqid5 : .................................................. :  300
```

```
                  *       320         *       340         *
Seqid1 : CTGGTTCTGAATCTGAACAAACCGGGCCAATACAATACCGAAGTACGCGG :  350
Seqid3 : ..................................................... :  350
Seqid5 : ..................................................... :  350

                360         *       380         *       400
Seqid1 : GAACAAAGTTTGGATATTCATTAACGAATCGGACGATACCGTGTCCGCCC :  400
Seqid3 : ..................................................... :  400
Seqid5 : ..................................................... :  400

                  *       420         *       440         *
Seqid1 : CCGCACGCCCCGCCGTAAAAGCCGCGCCTGCCGCACCGGCAAAACAACAG :  450
Seqid3 : ..................................................... :  450
Seqid5 : ..................................................... :  450

                460         *       480         *       500
Seqid1 : GGCTGCCGCACCGTCTACCAAGTCCGCAGTATCCGTATCCAAACCCTTTA :  500
Seqid3 : .-................................................... :  499
Seqid5 : .-.....................................G........... :  499

                  *       520         *       540         *
Seqid1 : CCCCGGCAAAACAACAG-CTGCCGCACCGTTTACCGAGTCCGTAGTATCC :  549
Seqid3 : ................G.................................. :  549
Seqid5 : ................G.................................. :  549

                560         *       580         *       600
Seqid1 : GTATCCGCACCGTTCAGCCCGGCAAAACAACAGGCGGCGGCATCAGCAAA :  599
Seqid3 : ..................................................... :  599
Seqid5 : ..................................................... :  599

                  *       620         *       640         *
Seqid1 : ACAACAGACGGCAGCACCAGCAAAACAACAGACGGCAGCACCAGCAAAAC :  649
Seqid3 : ..................................................... :  649
```

```
Seqid5 : .......G.....................G..... :  649

                660        *       680        *       700
Seqid1 : AACAGGCGGCAGCACCAGCAAAACAAACCAATATCGATTTCCGCAAAGAC :  699
Seqid3 : ..................................................... :  699
Seqid5 : ..................................................... :  699

                      *       720        *       740        *
Seqid1 : GGCAAAAATGCCGGCATTATCGAATTGGCTGCATTGGGCTTTGCCGGGCA :  749
Seqid3 : ..................................................... :  749
Seqid5 : ..................................................... :  749

                760        *       780        *       800
Seqid1 : GCCCGACATCAGCCAACAGCACGACCACATCATCGTTACGCTGAAAAACC :  799
Seqid3 : ..................................................... :  799
Seqid5 : ..................................................... :  799

                      *       820        *       840        *
Seqid1 : ATACCCTGCCGACCACGCTCCAACGCAGTTTGGATGTGGCAGACTTTAAA :  849
Seqid3 : ..................................................... :  849
Seqid5 : ..................................................... :  849

                860        *       880        *       900
Seqid1 : ACACCGGTTCAAAAGGTTACGCTGAAACGCCTCAATAACGACACCCAGCT :  899
Seqid3 : ..................................................... :  899
Seqid5 : ..................................................... :  899

                      *       920        *       940        *
Seqid1 : GATTATCACAACAGCCGGCAACTGGGAACTCGTCAACAAATCCGCCGCGC :  949
Seqid3 : ..................................................... :  949
Seqid5 : ..................................................... :  949

                960        *       980        *       1000
```

```
Seqid1 : CCGGATACTTTACCTTCCAAGTCCTGCCGAAAAAACAAAACCTCGAGTCA :  999
Seqid3 : ..................................................  :  999
Seqid5 : ..................................................  :  999

                  *      1020          *      1040          *
Seqid1 : GGCGGCGTGAACAATGCGCCCAAAACCTTCACAGGCCGGAAAATCTCCCT : 1049
Seqid3 : ..................................................  : 1049
Seqid5 : ..................................................  : 1049

                1060          *      1080          *      1100
Seqid1 : TGACTTCCAAGATGTCGAAATCCGCACCATCCTGCAGATTTTGGCAAAAG : 1099
Seqid3 : ..................................................  : 1099
Seqid5 : ..................................................  : 1099

                  *      1120          *      1140          *
Seqid1 : AATCCGGGATGAACATTGTTGCCAGCGACTCCGTCAACGGCAAAATGACC : 1149
Seqid3 : ..................................................  : 1149
Seqid5 : .......A...........................................  : 1149

                1160          *      1180          *      1200
Seqid1 : CTCTCCCTCAAAGACGTACCTTGGGATCAGGCTTTGGATTTGGTTATGCA : 1199
Seqid3 : ..................................................  : 1199
Seqid5 : ...........G..T..G.................................  : 1199

                  *      1220          *      1240          *
Seqid1 : GGCACGCAACCTCGATATGCGCCAACAAGGGAACATCGTCAACATCGCGC : 1249
Seqid3 : ..................................................  : 1249
Seqid5 : ...G.................G........T.....................  : 1249

                1260          *      1280          *      1300
Seqid1 : CCCGCGACGAGCTGCTTGCCAAAGACAAAGCCTTCTTACAGGCGGAAAAA : 1299
Seqid3 : ..................................................  : 1299
Seqid5 : ..............................C..........A.......  : 1299
```

```
                  *      1320          *      1340          *
Seqid1 : GACATTGCCGATCTAGGCGCGCTGTATTCACAAAACTTCCAATTGAAATA : 1349
Seqid3 : ..................................................... : 1349
Seqid5 : ............T.G..T...........C...........G........ : 1349

                1360          *      1380          *      1400
Seqid1 : CAAAAATGTGGAAGAATTCCGCAGCATCCTGCGTTTGGACAATGCCGACA : 1399
Seqid3 : ..................................................... : 1399
Seqid5 : ..................................................... : 1399

                  *      1420          *      1440          *
Seqid1 : CAACCGGAAACCGCAATACGCTTGTCAGCGGCAGGGGCAGCGTGCTGATC : 1449
Seqid3 : ..................................................... : 1449
Seqid5 : .G.............C......A........................... : 1449

                1460          *      1480          *      1500
Seqid1 : GATCCCGCCACCAATACCCTGATTGTTACCGATACCCGCAGCGTCATCGA : 1499
Seqid3 : ..................................................... : 1499
Seqid5 : .............C.................C................... : 1499

                  *      1520          *      1540          *
Seqid1 : AAAATTCCGCAAACTGATTGACGAATTGGACGTACCCGCGCAACAAGTGA : 1549
Seqid3 : ..................................................... : 1549
Seqid5 : ..................................................... : 1549

                1560          *      1580          *      1600
Seqid1 : TGATTGAGGCGCGTATCGTCGAAGCGGCAGACGGCTTCTCGCGCGATTTG : 1599
Seqid3 : ..................................................... : 1599
Seqid5 : ..................................................... : 1599

                  *      1620          *      1640          *
Seqid1 : GGCGTTAAATTCGGCGCGACAGGCAAGAAAAAGCTGAAAAATGATACAAG : 1649
Seqid3 : ..................................................... : 1649
```

```
Seqid5 : ..................................................  : 1649

                1660          *       1680          *       1700
Seqid1 : CGCATTCGGCTGGGGGGTAAACTCCGGCTTCGGCGGCGACGATAAATGGG  : 1699
Seqid3 : ..................................................  : 1699
Seqid5 : ..................................................  : 1699

                     *       1720          *       1740          *
Seqid1 : GGGCCGAAACCAAAATCAACCTGCCGATTACCGCTGCCGCAAACAGCATT  : 1749
Seqid3 : ..................................................  : 1749
Seqid5 : ..................................................  : 1749

                1760          *       1780          *       1800
Seqid1 : TCGCTGGTGCGCGCGATTTCCTCCGGTGCCTTGAATTTGGAATTGTCCGC  : 1799
Seqid3 : ..................................................  : 1799
Seqid5 : ..................................................  : 1799

                     *       1820          *       1840          *
Seqid1 : ATCCGAATCGCTTTCAAAAACCAAAACGCTTGCCAATCCGCGCGTGCTGA  : 1849
Seqid3 : ..................................................  : 1849
Seqid5 : ..................................................  : 1849

                1860          *       1880          *       1900
Seqid1 : CCCAAAACCGCAAAGAGGCCAAAATCGAATCCGGTTACGAAATTCCTTTC  : 1899
Seqid3 : ..................................................  : 1899
Seqid5 : ..................................................  : 1899

                     *       1920          *       1940          *
Seqid1 : ACCGTAACCTCAATCGCGAACGGCGGCAGCAGCACGAACACGGAACTCAA  : 1949
Seqid3 : ..................................................  : 1949
Seqid5 : ..................................................  : 1949

                1960          *       1980          *       2000
```

```
Seqid1 : AAAAGCCGTCTTGGGGCTGACCGTTACGCCGAACATCACGCCCGACGGCC : 1999
Seqid3 : ..................................................... : 1999
Seqid5 : ..................................................... : 1999

                  *      2020         *      2040         *
Seqid1 : AAATCATTATGACCGTCAAAATCAACAAGGACTCGCCTGCGCAATGTGCC : 2049
Seqid3 : ..................................................... : 2049
Seqid5 : ..................................................... : 2049

              2060         *      2080         *      2100
Seqid1 : TCCGGTAATCAGACGATCCTGTGTATTTCGACCAAAAACCTGAATACGCA : 2099
Seqid3 : ..................................................... : 2099
Seqid5 : ..................................................... : 2099

                  *      2120         *      2140         *
Seqid1 : GGCTATGGTTGAAAACGGCGGCACATTGATTGTCGGCGGTATTTATGAAG : 2149
Seqid3 : ..................................................... : 2149
Seqid5 : ..................................................... : 2149

             2160         *      2180         *      2200
Seqid1 : AAGACAACGGCAATACGCTGACCAAAGTCCCCCTGTTGGGCGACATCCCC : 2199
Seqid3 : ..................................................... : 2199
Seqid5 : ..................................................... : 2199

                  *      2220         *      2240         *
Seqid1 : GTTATCGGCAACCTCTTTAAAACACGCGGGAAAAAAACCGACCGCCGCGA : 2249
Seqid3 : ..................................................... : 2249
Seqid5 : ..................................................... : 2249

              2260         *      2280         *      2300
Seqid1 : ACTGCTGATTTTCATTACCCCGAGGATTATGGGTACGGCCGGCAACAGCC : 2299
Seqid3 : ..................................................... : 2299
Seqid5 : ..................................................... : 2299
```

```
                    *
Seqid1 : TGCGCTATTGA : 2310
Seqid3 : ........... : 2310
Seqid5 : ........... : 2310
```

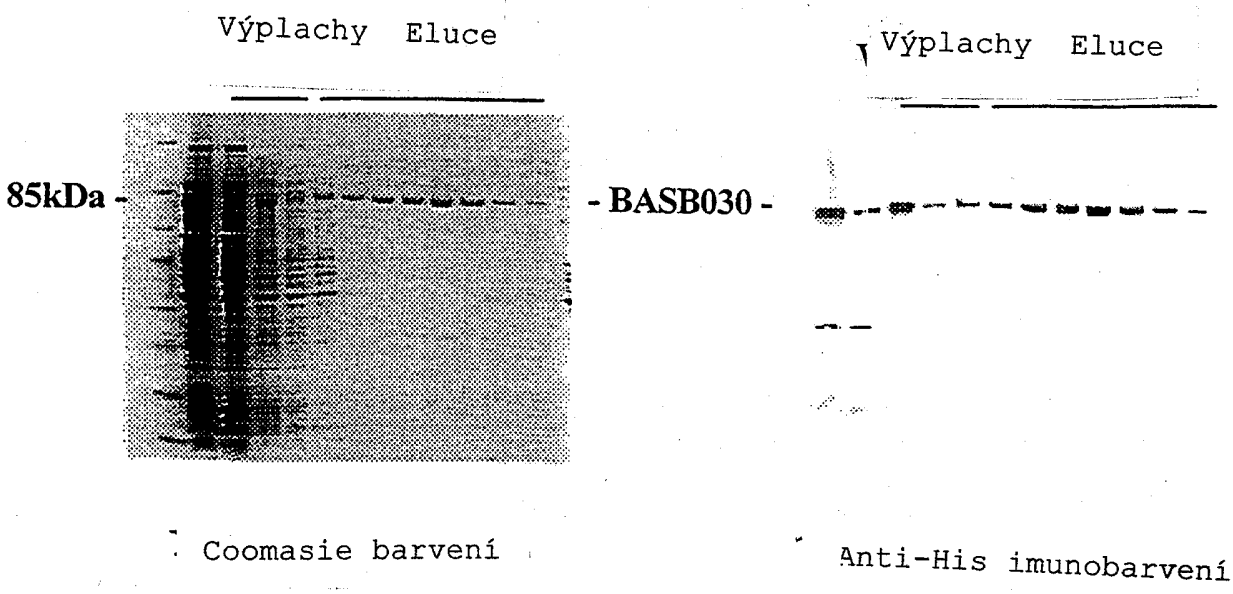
Obr. 2: Přiřazení BASB030 polypeptidových sekvencí. Identita se SEQ ID NO: 2 je znázorněna tečkou.

```
                  *         20         *         40         *
Seqid2 : MNTKLTKIISGLFVATAAFQTASAGNITDIKVSSLPNKQKIVKVSFDKEI :  50
Seqid4 : ..................................................... :  50
Seqid6 : ..................................................... :  50

                        60         *         80         *         100
Seqid2 : VNPTGFVTSSPARIALDFEQTGISMDQQVLEYADPLLSKISAAQNSSRAR : 100
Seqid4 : ..................................................... : 100
Seqid6 : ..................................................... : 100

                       *        120         *        140         *
Seqid2 : LVLNLNKPGQYNTEVRGNKVWIFINESDDTVSAPARPAVKAAPAAPAKQQ : 150
Seqid4 : ..................................................... : 150
Seqid6 : ..................................................... : 150

                     160         *         180         *         200
Seqid2 : GCRTVYQVRSIRIQTLYPGKTTAAAPFTESVVSVSAPFSPAKQQAAASAK : 200
Seqid4 : AAAPSTKSAVSVSKPFT.A.QQ.............................. : 200
Seqid6 : AAAPSTKSAVSVSEPFT.A.QQ.............................. : 200

                       *        220         *        240         *
Seqid2 : QQTAAPAKQQTAAPAKQQAAAPAKQTNIDFRKDGKNAGIIELAALGFAGQ : 250
Seqid4 : ..................................................... : 250
Seqid6 : ..A.......A.......................................... : 250

                     260         *         280         *         300
Seqid2 : PDISQQHDHIIVTLKNHTLPTTLQRSLDVADFKTPVQKVTLKRLNNDTQL : 300
Seqid4 : ..................................................... : 300
Seqid6 : ..................................................... : 300
```

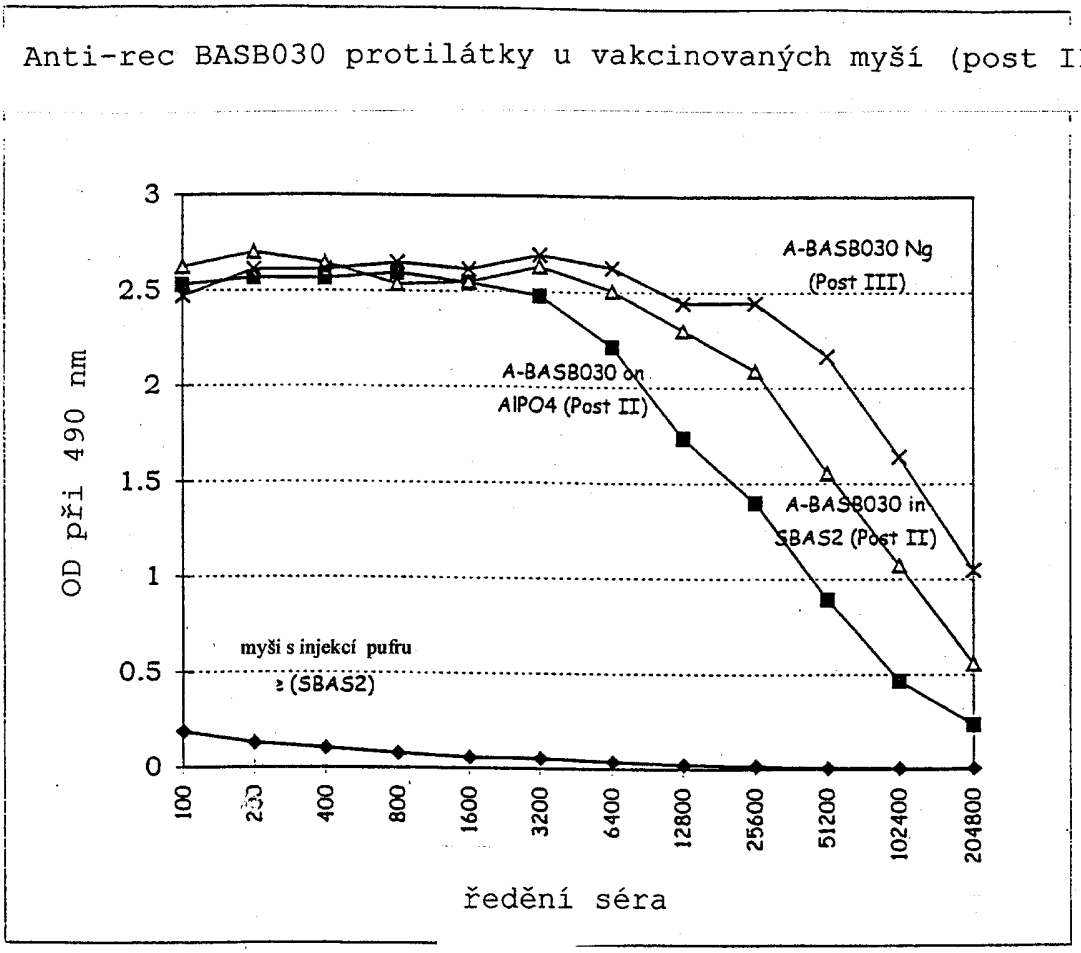
```
                  *       320         *       340         *
Seqid2 : IITTAGNWELVNKSAAPGYFTFQVLPKKQNLESGGVNNAPKTFTGRKISL : 350
Seqid4 : ..................................................... : 350
Seqid6 : ..................................................... : 350

                360         *       380         *       400
Seqid2 : DFQDVEIRTILQILAKESGMNIVASDSVNGKMTLSLKDVPWDQALDLVMQ : 400
Seqid4 : ..................................................... : 400
Seqid6 : ..................................................... : 400

                  *       420         *       440         *
Seqid2 : ARNLDMRQQGNIVNIAPRDELLAKDKAFLQAEKDIADLGALYSQNFQLKY : 450
Seqid4 : ..................................................... : 450
Seqid6 : ..........................L.......................... : 450

                460         *       480         *       500
Seqid2 : KNVEEFRSILRLDNADTTGNRNTLVSGRGSVLIDPATNTLIVTDTRSVIE : 500
Seqid4 : ..................................................... : 500
Seqid6 : ........................I............................ : 500

                  *       520         *       540         *
Seqid2 : KFRKLIDELDVPAQQVMIEARIVEAADGFSRDLGVKFGATGKKKLKNDTS : 550
Seqid4 : ..................................................... : 550
Seqid6 : ..................................................... : 550

                560         *       580         *       600
Seqid2 : AFGWGVNSGFGGDDKWGAETKINLPITAAANSISLVRAISSGALNLELSA : 600
Seqid4 : ..................................................... : 600
Seqid6 : ..................................................... : 600

                  *       620         *       640         *
Seqid2 : SESLSKTKTLANPRVLTQNRKEAKIESGYEIPFTVTSIANGGSSTNTELK : 650
```

```
Seqid4 : ..................................................... : 650
Seqid6 : ..................................................... : 650

                660         *       680         *       700
Seqid2 : KAVLGLTVTPNITPDGQIIMTVKINKDSPAQCASGNQTILCISTKNLNTQ : 700
Seqid4 : ..................................................... : 700
Seqid6 : ..................................................... : 700

                    *       720         *       740         *
Seqid2 : AMVENGGTLIVGGIYEEDNGNTLTKVPLLGDIPVIGNLFKTRGKKTDRRE : 750
Seqid4 : ..................................................... : 750
Seqid6 : ..................................................... : 750

                760
Seqid2 : LLIFITPRIMGTAGNSLRY : 769
Seqid4 : ................... : 769
Seqid6 : ................... : 769
```

Obr. 3. Exprese a přečištění rekombinantního BASB030 v E. coli

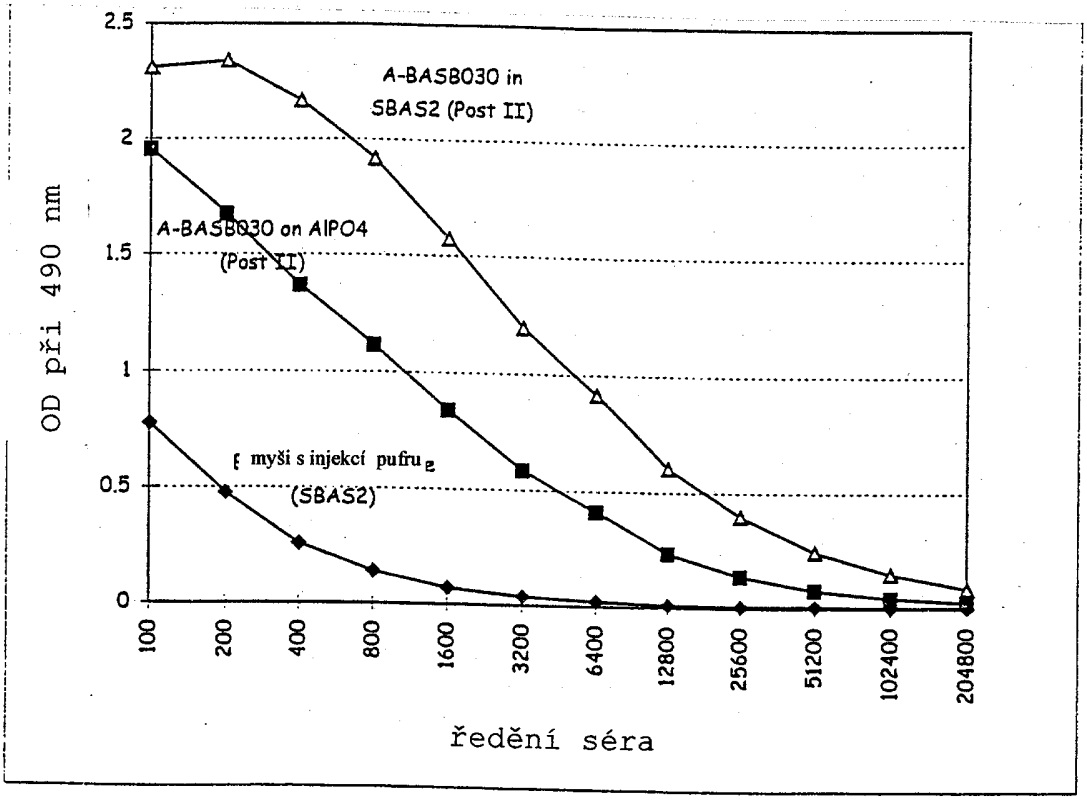


Obr. 4... Imunogenicita přirozeného BASB030 polypeptidu.
Analýza odpovědi proti přirozenému BASB030 polypeptidu při použití rekombinantního BASB030 pomocí ELISA

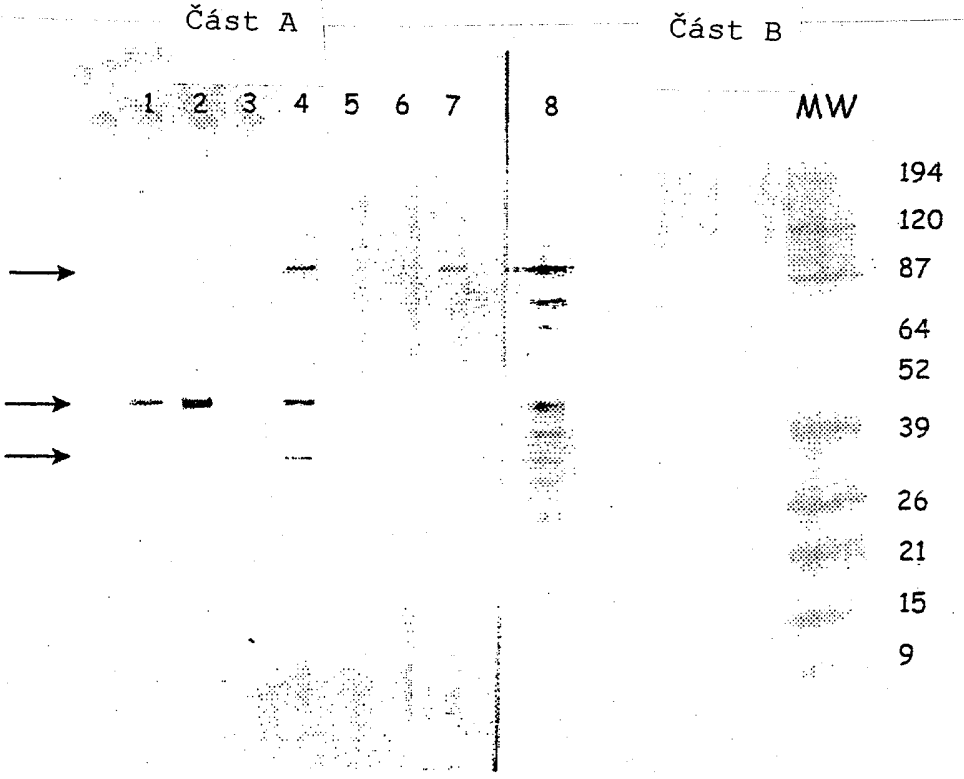


Obr. 5. Imunogenicita přirozeného BASB030 polypeptidu. Analýza odpovědi proti přirozenému BASB030 polypeptidu při použití celých buněk pomocí ELISA

Anti-rec BASB030 protilátky podle ELISA na celých buňkách (post II)

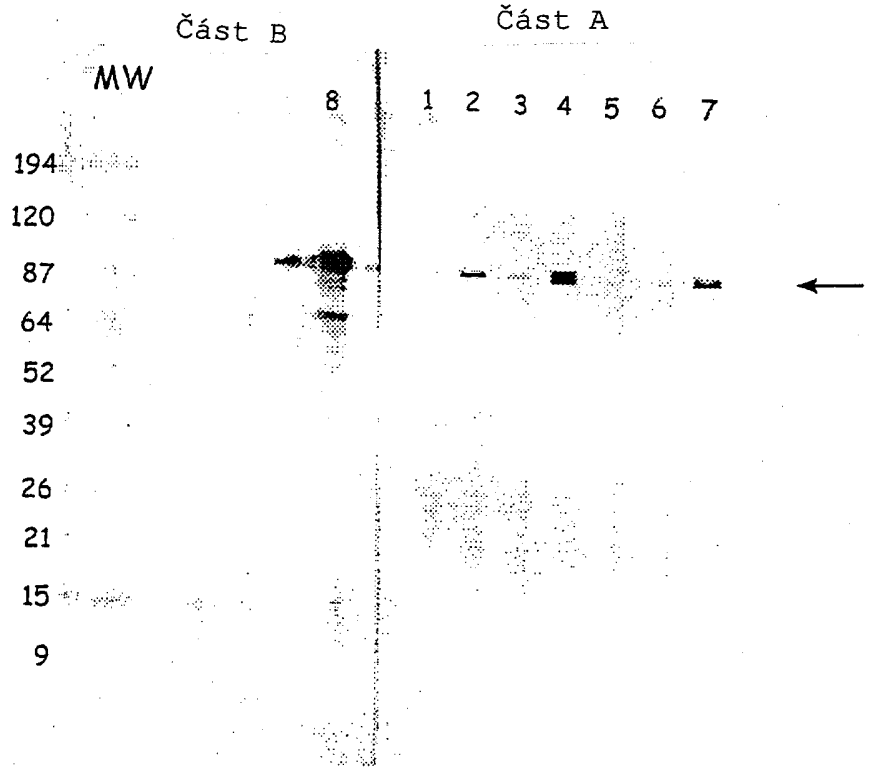


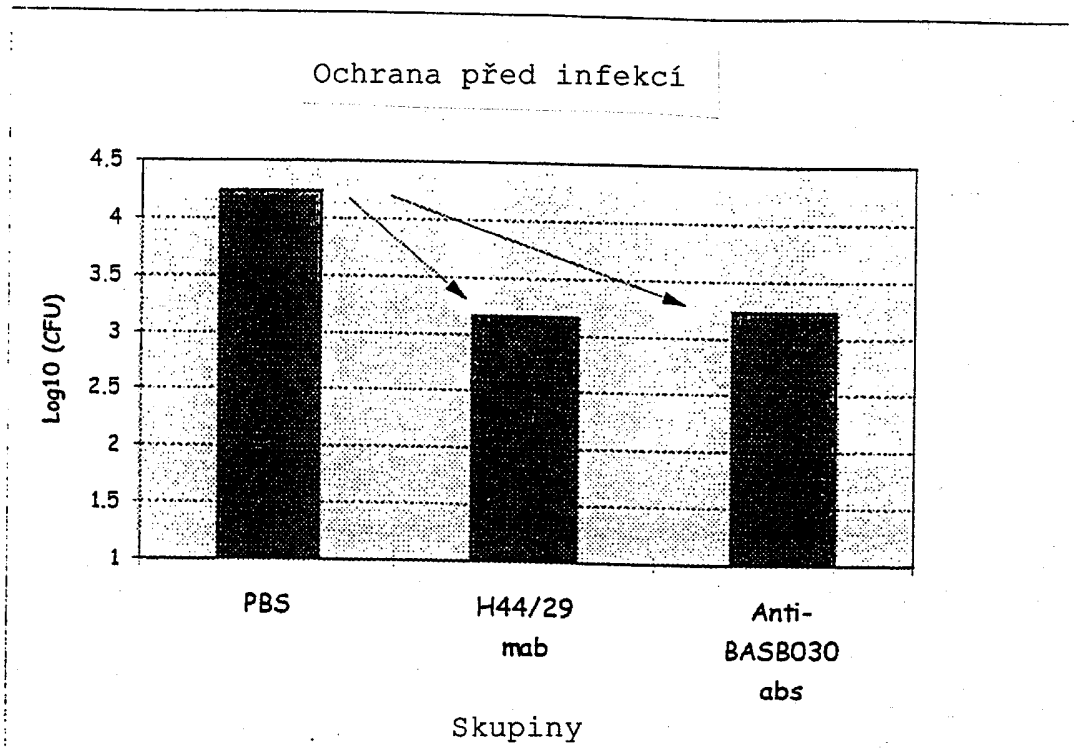
Obr. 6: Anti-BASB030 protilátky u lidských pacientů v rekonvalescenci (část A) a u imunizovaných myší (část B) podle westernovi hybridizace za použití přirozeného BASB030 v gelu



Dráhy:
1: rekonvalescentní sérum č. 262068
2: rekonvalescentní sérum č. 261732
3: rekonvalescentní sérum č. 262117
4: rekonvalescentní sérum č. 261659
5: rekonvalescentní sérum č. 261469
6: rekonvalescentní sérum č. 261979
7: rekonvalescentní sérum č. 261324
8: soubor sér od myší imunizovaných homologem BASB030 proteinu od Neisseria gonorrhoeae

Obr. 7: Anti-BASB030 protilátky u lidských pacientů v rekonvalescenci (část A) a u imunizovaných myší (část B) podle westernovi hybridizace za použití rekombinantního BASB030 v gelu



Dráhy:
1: rekonvalescentní sérum č. 262068
2: rekonvalescentní sérum č. 261732
3: rekonvalescentní sérum č. 262117
4: rekonvalescentní sérum č. 261659
5: rekonvalescentní sérum č. 261469
6: rekonvalescentní sérum č. 261979
7: rekonvalescentní sérum č. 261324
8: soubor sér od myší imunizovaných homologem BASB030 proteinu od Neisseria gonorrhoeae

Obr. 8. Protektivní efekt anti-BASB030 protilátek v modelu pasivní imunizace