



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 35 419 T2** 2008.02.28

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 194 560 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 35 419.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IB00/00831**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 931 512.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/071574**

(86) PCT-Anmeldetag: **19.05.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **30.11.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **10.04.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **04.07.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **28.02.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/31** (2006.01)

C07K 14/22 (2006.01)

A61K 39/095 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9911683 19.05.1999 GB

(73) Patentinhaber:

Novartis Vaccines and Diagnostics S.r.l., Siena, IT

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**Masignani, Vega, 53100 Siena, IT; Scarlato,
Vincenzo, 53100 Siena, IT; Scarselli, Maria, 53100
Siena, IT; Galeotti, Cesira, 53100 Siena, IT; Mora,
Maria Rosa, 53100 Siena, IT**

(54) Bezeichnung: **ANTIGENE PEPTIDE AUS NEISSERIA**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Diese Erfindung betrifft antigene Peptidsequenzen aus den Bakterien *Neisseria meningitidis* und *Neisseria gonorrhoeae*.

HINTERGRUND

[0002] *Neisseria meningitidis* und *Neisseria gonorrhoeae* sind nicht-motile, Gram-negative Diplococci, welche für Menschen pathogen sind.

[0003] Basierend auf dem kapsulären Polysaccharid des Organismus wurden 12 Serogruppen von *N. meningitidis* identifiziert. Gruppe A ist das Pathogen, das am häufigsten epidemische Erkrankungen im subsaharischen Afrika verursacht. Die Serogruppen B und C sind für die große Mehrheit von Fällen in den Vereinigten Staaten und in den meisten Industrieländern verantwortlich. Die Serogruppen W135 und Y sind für den Rest der Fälle in den Vereinigten Staaten und in den Industrieländern verantwortlich.

[0004] Der Meningococcen-Impfstoff, welcher derzeit in Verwendung ist, ist ein tetravalenter Polysaccharid-Impfstoff, der aus den Serogruppen A, C, Y & W135 zusammengesetzt ist, aber MenB bleibt ein Problem. Der Polysaccharid-Ansatz kann nicht angewendet werden, da das kapsuläre MenB-Polysaccharid ein Polymer einer $\alpha(2-8)$ -verknüpften N-Acetylneuraminsäure ist, welche auch in Säugergeweben vorhanden ist. Ein Ansatz für einen MenB-Impfstoff verwendet Gemische von äußeren Membranproteinen (OMPs). Um die antigene Variabilität zu umgehen, wurden multivalente Impfstoffe, die bis zu neun verschiedene Porine enthalten, konstruiert [z. B. Poolman JT (1992) Development of a meningococcal vaccine. Infect. Agents Dis. 4: 13-28]. Zusätzliche Proteine zur Verwendung bei Äußeren-Membranprotein-Impfstoffen waren die opa und opc-Proteine, aber keiner dieser Ansätze war in der Lage, die antigene Variabilität zu umgehen [z. B. Ala'Aldeen & Borriello (1996), The meningococcal transferrin-binding Proteins 1 and 2 are both surface exposed and generate bactericidal antibodies capable of killing homologous and heterologous strains. Vaccine 14(1): 49-53].

DIE ERFINDUNG

[0005] Die Erfindung stellt Fragmente des ORF-1-Proteins bereit, das in der internationalen Patenanmeldung WO99/24578 offenbart wird, worin die Fragmente mindestens eine antigene Determinante umfassen.

[0006] Spezifisch stellt die Erfindung ein Protein, umfassend ein Fragment von SEQ ID 650 aus WO99/24578:

MKTTDKRTTETHRKAPKTGRIRFSPAYLAICLSFGILPQAWAGIITYFGINYQY
 YRDFAEKNGKFAVGAKDIEVYNKKGELVGKSMTKAPMIDFSVVSRRNGVAAL
 VGDQYIVSVAHNGGYNVDFGAEGRNPDQHRFTYKIVKRNNYKAGTKGHPY
 GGDYHMPRLHKFVTDAEPVEMTSYMDGRKYIDQNNYPDRVRIGAGRQYWRS
 DEDEPNNRESSYHLASAYSWLVGGNTFAQNGSGGGTVNLGSEKIKHSPYGFLLP
 TGGSGGDSGSPMFIYDAQKQKWLINGVLQTGNPYIGKSNGTQLVRKDWFYDEI
 FAGDTHSVFYEPQNGKYSFNDNNGTGKINAKHEHNSLPNRLKTRTVQLFN
 VSLSETAREPVYHAAGGVNSYRPRLNNGENISFIDEGKGELILTSNINQGAGGL
 YFQGDFTVSPENNETWQGAGVHISEDSTVTWKVNGVANDRLSKIGKGTLLHVQ
 AKGENQGSISVGDGTVILDQQADDKGKKQAFSEIGLVSGRGTVQLNADNQFNP
 DKLYFGFRGGRLDLNGHSLSFHRIQNTDEGAMIVNHNQDKESTVTITGNKDIA
 TTGNNSLDSKKEIAYNGWFGKDTTKTNGRILNLVYQPAEDRILLSSGGTN
 LINGNITQTNGKLFFSGRPTPHAYNHLNDHWSQKEGIPRGEIVWDNDWINRTFK
 AENFQIKGGQAVVSRNVAKVKGDWHLSNHAQAVFGVAPHQSHTICTRSDWT
 GLTNCVEKTITDDKVIASLTKTDISGNVDLADHAHLNLTLGLATLNGNLSANGD
 TRYTVSHNATQNGNLSLVGNAQATFNQATLNGNTSASGNASFNLSDHAVQNG
 SLTLSGNAKANVSHSALNGNVSLADKAVFHFESSRFTGQISGGKDTALHLKDS
 EWTLPSTGTELGNLNLDNATITLNSAYRHDAAGAQTGSATDAPRRRSRRSRRSL
 LSVTPPTSVESRFNTLTVNGKLNQGTFRFMSELFGYRSDKIKLAESSEGTYTL
 AVNNTGNEPASLEQLTVVEGKDNKPLSENLFNLQNEHVDAGAWRYQLIRKD
 GEFRIIINPVKEQELSDKLGKAEAKKQAEKDNAQSLDALIAAGRDAVEKTESV
 AEPARQAGGENVGMQAEEEEKKRVQADKDTALAKQREAETRPATTAFPRARR
 ARRDLPLQLPQPQPQPQRDLISRYANSGLSEFSATLNSVFAVQDELDRVFAEDR
 RNAVWTSGIRDTKHYRSQDFRAYRQQTDLRQIGMQKNLGSGRVGILFSHNRT
 ENTFFDDGIGNSARLAHGAVFGQYGIDRFYIGISAGAGFSSGSLSDGIGGKIRRRV
 LHYGIQARYRAGFGGFGIEPHIGATRYFVQKADYRYENVNIATPGLAFNRYRA
 GIKADYSFKPAQHISITPYLSLSYTDAAASKVRTRVNTAVLAQDFGKTRSAEW
 GVNAEIKGFTLSLHAAAAGKGPQLEAQHSAGIKLGYRW

bereit,
 wobei das Fragment:

(a) ein oder mehrere der Aminosäurefragmente 9-18, 71-73, 83-87, 118-120, 174-

179, 191-193, 351-354, 360-363, 368-372, 381-384, 494-497, 545-549, 650-657, 696-700, 709-711, 732-741, 748-752, 771-775, 809-811, 874-878, 926-932, 934-939, 972-977, 1001-1004, 1007-1014, 1055-1059, 1064-1069, 1074-1076, 1084-1087, 1093-1108, 1153-1156, 1182-1186, 1188-1192, 1197-1202, 1214-1224, 1228-1232, 1243-1246, 1261-1271, 1302-1305, 1391-1394, 1410-1415, 1-23, 66-87, 115-120, 124-161, 168-175, 178-218, 229-231, 233-241, 246-256, 260-270, 276-279, 293-299, 301-308, 316-319, 322-359, 367-375, 383-394, 396-405, 410-415, 425-435, 441-448, 455-467, 471-486, 490-501, 516-525, 559-566, 570-591, 593-608, 615-621, 632-640, 642-650, 653-667, 671-690, 693-710, 719-722, 727-748, 752-764, 779-790, 793-799, 815-827, 829-835, 843-849, 860-862, 869-904, 914-944, 948-957, 961-970, 980-994, 1000-1008, 1013-1027, 1034-1037, 1045-1054, 1056-1083, 1090-1113, 1117-1160, 1162-1175, 1177-1184, 1197-1211, 1215-1238, 1240-1250, 1256-1273, 1286-1288, 1293-1295, 1297-1314, 1321-1329, 1334-1337, 1345-1352, 1363-1379, 1391-1403, 1410-1419, 1424-1427, 1437-1450, 56-64, 66-82, 124-136, 140-151, 180-187, 190-199, 202-217, 237-239, 246-252, 263-268, 324-328, 331-359, 369-375, 385-393, 428-432, 441-447, 455-464, 471-477, 519-523, 560-566, 571-577, 582-591, 596-606, 658-667, 697-703, 737-748, 752-756, 761-764, 782-788, 869-873, 878-892, 916-922, 927-943, 950-956, 964-967, 981-993, 1002-1008, 1015-1025, 1090-1111, 1117-1144, 1149-1159, 1165-1174, 1197-1210, 1243-1249, 1257-1269, 1271-1273, 1301-1304, 1306-1314, 1321-1325, 1346-1352, 1364-1371, 1373-1375, 1395-1403, 1411-1419, 1437-1447, 53-64, 162-175, 174-218, 300-308, 381-394, 490-503, 545-554, 560-566, 642-657, 650-667, 693-711, 727-752, 748-764, 1000-1014, 1007-1027, 1162-1178, 1174-1184, 1214-1238, 300-304, 368-375, 545-554, 678-686, 696-703, 732-748, 748-756, 874-882, 926-943, 1001-1008, 1002-1014, 1055-1083, 1165-1178, 1287-1771, 1261-1273, 1301-1305, 926-939, 1182-1192, 1162-1184, 229-241, 293-308, 383-405, 570-608, 632-650, 815-835, 1045-1083, 1117-1175, 1162-1184, 1215-1250, 1293-1314, 56-82, 66-86, 1257-1273, 1301-1314 und/oder 1364-1375 von SEQ ID 650 umfasst,

und

- (b) mindestens eine antigenische Determinante von SEQ ID 650 umfasst, und
- (c) nicht mehr als 1456 Aminosäuren von SEQ ID 650 hat, und
- (d) nicht mehr als 1449 Aminosäuren von SEQ ID 648 aus WO99/24578 hat

```

1 MKTTDKRTTE THRKAPKTGR IRFXAAYLAI CLSFGILPQA WAGHTYFGIN
51 YQYYRDFAEF KGFVAVGAKD IEVYNKKGEL VGKSMTKAPM IDESVVSRNG
101 VAALVGVQYI VSVAHNGGYN NVDFGAEQXN IXDQXKTYK TVKRNKYKAG
151 TKGHPYGGDY HMPRLHKXVT DAEPVEMTSY MDGRKYIDQN NYPDVRVIGA
201 GRQYWRSEED EPNNRESSYH IAS.....GS PMFIYDAOKQ
251 KWLINGVLQT GNPYIGKSNG FQLVRKDWFY DEIFAGDTHS VFYEPRONGK
301 YSFNDNNGT GKNAKHEHN SUPNRLKTRT VQLNVSLSE TAREPVYHAA
351 GGVNSYRPRL NNGENISFID EKGCELILTS NINQGAGGLY FQGDFTVSPE
401 NNETWQAGAV HISEDSTVTW KVNQVANDRL SKIGKGTLL.....
//
701 .....DKVTAS LTKTDISGNV DLADHAMLNL TGLATLNGNL
751 SANGOTRYTV SHNATONGNX SLVXNAQATF NQATLNGNTS ASGNASENLS
801 DHAVQNGSLT LSGNAKANVS HSALNGNVS LADKAVEMFES SRFTGQISGG
851 KDTALHLKDS EWTLPSCXEL GNLNLDNATI TLNSAYRHDA AGAQTGSATD
901 APRRRSRRSR RSLXVTPPT SVESRENTLT VNGKLNQGT FRFMSELEGY
951 RSDKLKLAES SEGTYTLAVN NTGNEPASLE QLTVEGKDN KPLENLNFT
1001 LQNEHVDAGA W.....
//
1151 .....LDRVFAEDR
1201 RNAVWTSRIR DTKHYRSQDF RAYRQTDLR QIGMQKNLGS GRVGILFSHN
1251 RTENTFDDGI NSARLAHGA VGGYQIGDF YIGISAGAGF SSGSLSDGIG
1301 KXKRRVLHY IQARYRAGF GGFIEPHIG ATRYFVQKAD RYENVNIAI
1351 GLAFNRIRYR IKADYSFKP AQHSITPYL LSYTDAASG KVRTRVNTAV
1401 LAQDFGKTRS AEWGVNAEIK GTLSLHAAA AKGFQLEACH SAGIKLGYRW, und

```

(e) nicht mehr als 1448 Aminosäuren von SEQ ID 652 aus WO99/24578 hat

```

1 MKTTDKRTTE THRKAPKTGR IRFSPAYLAI CLSFGILPQA WAGHTYFGIN
51 YQYYRDFAEF KGFVAVGAKD IEVYNKKGEL VGKSMTKAPM IDESVVSRNG
101 VAALVGVQYI VSVAHNGGYN NVDFGAEQXN PDQHRFSYQI VKRNKYKPDN
151 SHPYNGDXHM PRLHKFVTDG EPVEMTSOMR GNTYSDKEKY PERVRIGSGH
201 HYWRYDDDKH GDLSYSGAWL IGGNTHMQGW GNGVXSLSG DVRHANDYGP
251 MPIAGAAGDS GSPMFIYDKT MNKWLNLGV LQTGYFYSCRE NGFQLIRKDW
301 FYDDIYRGDT HTVXFEPASN GHFSFTSNMN GTGTVTETNE KVSNPKLKVQ
351 TVRLEDESLN ETDKEPVYAA GGVNQYRPRL NNGENLSFID YGNGKLILSN
401 NINQGAGGLY FEGDFTVSPE NNETWQAGAV HISEDSTVTW KVNQVANDRL
451 SKIGKGTLLH VQAKGENOGSI SVGDGTVILD QQADKKGKKQ AFSEIGLXSG
501 RGTVQLNADN QFNPKLYFG FRGGRDLNG HSLSEHRIQN TDEGAMIXXH
551 NATTTSTVTI TGNESITQPS GKNNRLNYS KEIAYNGWFG EKDTTKTNGR
601 LNLVYQFAAE DRTXLLSGGT NLNGNITQTN GKLFESGRPT PHAYNHLGSG
651 WSKMEGIPQG ELVWDNDWIX RTFKAENFHI QGGQAVISRN VAKVEGDKHL
701 SNHAQAVFGV APIQSHTICT RSDWTGLTNC VEXXITDQKV IASLTKTDXS
751 GXVXLXXXXX XXLXGXAXLX GNLSANGDTR YTVSHNATQN GNLSLVGNAQ
801 ATFNQATLNG NXSXSGNASF NLSNKAQNG SLTSDNAKA NVSHSALNGN
851 VSLADKAVFH FENSREFTGQL SGSKXTALHL KDSEWTLPSG TELGNLNDN
901 ATITLNSAYR HDAAGAQTGX VSDTPRRRSR RSLLSVTPPT SVESRENTLT
951 VNGKLNQGT FRFMSELEGY RSDKLKLAES SEGTYTLAVN NTGNEPVSLD
1001 QLTVEGKDN KPLENLNFT LQNEHVDAGA WRVQLIRKDG EFFEHPVKE
1051 QELSDKLGKA EAKKQAEKDN AQSLDALIPA GRQAEKTES VAEPANXAGG
1101 ENVSIMQAE EKKRVQADKD SALAKQREAE TRFXTTAFPR ARXARROLPO
1151 PQFPQFPQFPQ PQDLSRYA NSGLSEFSAT LNSVFAVQDE LDRVFAEDR
1201 NAVWTSXIRX TKHYRSQDF RAYRQTDLR QIGMQKNLGS RVGILFSHN
1251 TENFDDGIG NSARLAHGA VGGYQIGDF YIGISAGAGF SSGSLSDGIG
1301 KIRKVLHYG IQARYRAGF GGFIEPHIG ATRYFVQKAD RYENVNIAI
1351 GLAFNRIRYR IKADYSFKP AQHSITPYL LSYTDAASG KVRTRVNTAV
1401 AQDFGKTRS AEWGVNAEIK GTLSLHAAA AKGFQLEACH SAGIKLGYRW, und

```

(f) nicht mehr als 1467 Aminosäuren von SEQ ID 654 aus WO99/24578 hat

1 MKTTDKRTTE THRKAKTKGR IRFSPAYLAI CLSPGILPQA RAGHTYFGIN
 51 YQYYRDEFAEN RGRFVAGAKD IEVYNKKGEL VGKSMTKAPM IDESVVSRNG
 101 VAALAGDQYI VSAHNGGYN NVDFGAEGSN PQQHRFSYQI VKRNNYKAGT
 151 NGRPYGGDYH MPRLHKFVTD AEPVEMTSYM DQNKYADLNK YPDRVRIGAG
 201 RQYWRSDDEE PNNRESSYHI ASAYSNLVGG NTFQNGSGG GTVNLGSEKI
 251 KHSFYGFELPT GGSFGDSGSP MFIYDAQKQK WLVNGVLQTG NPYIGKSNF
 301 QLVKDKWFYD EIFAGDTHSV FYEPHQNGKY FENDMNGAG KIDAKHKHYS
 351 LEPRLKTRTV QLENVSLSET AREPVYHAAG GVNSYRPRIN NGENISFIDK
 401 GKGEILITSN INQAGGLYF EGNFTVSPKN NETWQAGGVH ISDGSTVTWK
 451 VNGVANDRLS KIKGTLTVQ AKGENOGSIS VGDGKVLDO QADDQGGKQA
 501 FSEIGLVSGR GTVQLNADNQ ENFDKLYFGF HGGRLDLNGH SLSPHRIQNT
 551 DEGAMIVNHN QDKESTVTIT GNKDITTTGN NNNLDSKKEI AYNGWFGKD
 601 ATKTNGLNL NYPPEADRT LLLSGSTNLM GNITQTNGL FFSGRPTPHA
 651 YNHLGSGWSEK MEGIPQGEIV WDNDWIDRTF KAENPHIQGG QAVVSRNVAK
 701 VEGDWHLSNH AQAVFGVAPH QSHITCTRSO WTGLTSCTEK TITDDKVIAS
 751 LSKTDVRGNV SLADHAHLNL TGLATFNGNL VQAEITTRL RANATQNGNL
 801 SLVGNAGATF NQATLNGNTS ASDNASFNLS NNAVONGSLT LSDNAKANVS
 851 HSALNGNVSL ADKAVHFHFN SMTTKISGG KDTALHLKDS EWTLPSTEL
 901 GNLNLDNATI TLNSAYRHA AGAQTGSAD APRRRSRSL LSVTPPTSAB
 951 SRENTLTUNG KLNQGGTFRF MSELFGYRSG KLKLAESSEG TYTLAVNNTG
 1001 NEPVSLQLT VVEGKNTPL SENLNTLON EHVDAWRY QLIRKDGFR
 1051 LHPVVKQEL SOKLKGAT EAALAKQAQ LAAKQAEKD KAQSIDALIA
 1101 AGNATEKAE SVAEPARQAG GENAGINQAE EEKKRVQADK DTALAKQREA
 1151 ETRPATTAEP RARRAKNLP QPQPQPQP QRLISRYAN SGLSEFSATL
 1201 NSVFAVQDEL DRVFAEDRRN AVWTSIGIRT KHYSQDFRA YRQTDLRQI
 1251 GMQKNLGGSR VGILFSHNR NTTFDDGIGN SARLANCAVF GQYIGREFDI
 1301 GTSAGAGFSS GSLSDGIRGK IRRRLHYGI QARYRAGFGG EGIEPHIGAT
 1351 RYFVQKADYR YENVNIATPG LAFNRYRAGI KADYSEKPAQ HISITPYLSL
 1401 SYTDAASGV RTRVNTAVLA QDFGKTRSAE WGVNAEIKGE TLSLHAAAK
 1451 GPQLEAQHSA GIKLYRW, und

(g) nicht SEQ ID 2

MKTTDKRTTETHRKAKTKGRIRFSPAYLAICLSPGILPQAHAGHTYFGIN YQYYRDEFAEN
 RGRFVAGAKDIEVYNKKGELVGKSMTKAPMIDFSVVSRNOVAALVGDQYIVSAHNGGYN
 NVDFGAEGSNPQQHRFSYQIVKRNNYKAGTNGHPYGGDYHMPRLHKFVTD AEPVEMTSYM
 DQNKYADQNYPDRVRIGAGRQYWRSDDEEPNNRESSYHIASAYSNLVGGNTFAQNGSGG
 GTVNLGSEKIKHSFYGFELPTGGSFGDSGSPMFIYDAQKQKWLINGVLQTNPNYIGKSNF
 QLVKDKWFYDEIFAGDTHSVFYEPHQNGKYTFENDMNGTGKINAKHEHNSLPHRLKTRTV
 QLENVSLSETAREPVYHAAGGVNSYRPRINNGENISFIDEGKGEILITSNINQAGGLYF
 QGDTVSPENNETWQAGGVHISEDSTVTWKVNGVANDRLSKIKGTLTVQAKGENOGSIS
 VGDGKVLDOQADENNEKCAPSEIGLVSGRGTVQLNADNQENFDKLYFGFRRGRLDLNGH
 SLSPHRIQNTDEGAMIVNHNQDKESTVTITONKDITATGNNLDSKKEIAYNGWFGKD
 TTKTNGLNLNVYOPAAEDRTLILLSGGTNLNGNITOTNGKLFFSGRPTPHAVNHLGSGWSEK
 MEGIPQGEIVWDNDWIDRTFKAENPHIQGGQAVVSRNVAKVEGDWHLSNHAQAVFGVAPH

QSHITCTRSOWTGLTNEVKTITDDKVIASLTITDISGNYSLADHAHLNL TGLATFNGNL
 SANGDTRYTVSHNATONQDLSLVGNAGATFNQATLNGNTSASGNASFNLSKNAVONGSLT
 LSDNAKANVSHSALNGNVSLADKAVHFHFESESRPTGQISGSKDTALHLKDSFWTLPSTEL
 GNLNLDNATI TLNSAYRHAAGAQTGSATAPRRRSRSLLSVTPPTSABSENHTLTUNG
 KLNQGGTFRFMSELFGYRSDKLKLAESSEGTYTLAVNNTGNEPVSLDQLT VVEGKNTPL
 SENLNTLONEHVDAWRYQLIRKDGFRLEHNFVKQELSDKLOKAEAKQAGKDAQGE
 LDALIAAGKDAVEKTESVAEPARQAGGENVGIQAE EEKKRVQADKDTALAKQREGKTRP
 ATTAFPRARRAPRDLPOPQPQPQPQQRDLISRYANSGLSEFSATLNSVFAVQDELDRVF
 AEDRRNAVWTSIGIRDTKHYSQDFRAYRQOTDLRQIOMQKNLGGSRVGILFSHNRTEFTF
 DDGIGNSARLANCAVFQYQYIGREFDIGISTAGFSSGSLSDDIESKIRRLHYGIQARY
 RASPOGPGIEPHIGATRYFVQADYRYENVNIATPG LAFNRYRAGIKADYSEKPAQHISIT
 PYLSLSYTDAASGV RTRVNTAVLAQDFGKTRSAEWGVNAEIKGFTLSLHAAAKGPQLE
 AQHSA GIKLYRW

MKTTDKPTTETHRKLPKTRIRFSPAYLAICLSFGILPQWAGHTYFGIKYQYYRDFRHW
 KCKTAVGAKDIEVYNKRGELVGKSKTKAPMIDFSVVERNGVLAALVGDQYIVSVAHDEGYN
 NVDFGARGENPDQHRFTYKIVRBNYKAGTKGHPYGGDYHMPRLHKFVTOAEFVBETSYM
 DGRKYIDQWNPORVRICAGROYWREDEDEPNKRESSYHTASAYSXKLVGGHTFAQNOCSG
 GTVNLSEBQKHSPYGFLPTGSSPGBSGSPMFIYDAQKQKWLINGVLQGTGNPYIGKSNGP
 QLVKRDWIFYDEIFAGDTHSVFYSPRQNGKYSFWDDNNDGKINAKHEHMSLENRLKTRTV
 QLPNVLSSETAREPVYIAAGOVNSYRPRELNGENTSFIDEGEGELILTENINGAGGLYF
 QGDFTVSPENNETWQAGVHISDSSTVTWKNVCVANDRLSKICKOTLHVQAKGENOGSIS
 VGDQTVILQQQADDKQKQAFSEIGLVSGRGTVQLNADNQFNPDKLYPGRGGRDLNGH
 SLSFHRICQNTDEGAMIVHNNQDNSTVTITGNKDIATTGNENSLDSKKEIAYMCHPGEKD
 TTKTNGRLNLVYQPAEDRTLILLSGOTNLNONTITQTNGLFTSGRPTPHAYNHLNDKWSQ
 KESI FRGSTVWDNDWINRTPKAENFOIKGQAVVSPNVAKVYKEDPHLSNHAQAVFGVAPH
 QSHTICTRSDWTGLTNCVENTITDDKVLASLTKTDISGNVLDADBAHLNLGLATLNGNL
 SAKGDTRYTVSHNATQNGNLSLVGNAQATFNQATLNGNTSASQNASFNLSDHAVJNGSLT
 LSGNAKANVSHSALNQNVS LADKAVPHFESSRFTGQISOGKDTALNLKDS EWTLPSTEL
 GMLNLDNATITLNSAYIMDAAGACTESATDAPRRRSRRSERSLLSVTPPTS VESRFTLT
 VNGKLNQSTFRFMSLPGYRSDKLNLAESSECTYTTLAVNNTGNEFASLEQLTVVEGKDN
 KPLSENENFTLQNEHVTAGAKRYQLIRKGEFRLHNVPVKEQELSDKUGFAZAKKQAEKDN
 AQSLDALIAAGRDAVEKTESVAEPARQAGGENVOINQAEKEKKRVQADKDTALAKQREAE
 TRPATTAPFRARRARRDLFQLQPCQPQPOPOEDLISRYANSGLSEFSATLNSVFAVQDELD
 RVEFAEERRNAVWTSQIRDTKHYSODYRAYROOTLRQIQMQLKLGSCRVOTLPSHNRTZ
 NTPDDGIGNSARLAKSAVFGQYGTDRFYIGLSAGAGFS SCSLSDGIGGKERRRVLHYGIO
 ARYRAGFGGFGIEPHIGATRYFVQKADYRYENTATPCLAFNRYRAGIKADYSFKBAQH
 ISITPYLSLSYTDASGKVRTRWTVAVLAQDFTKTRSAEWGVNAEIKOPTLSLRMAAKC
 PQLEAQHSAGIKLGYRW.

[0007] Die erfindungsgemäßen Proteine können natürlich mit verschiedenen Mitteln (z. B. rekombinante Expression, Reinigung aus Zellkultur, chemische Synthese etc.) und in verschiedenen Formen hergestellt werden (z. B. native, C-terminale und/oder N-terminale Fusionen etc.). Sie werden bevorzugt in im Wesentlichen reiner Form hergestellt (d. h. im Wesentlichen frei von anderen Neisseria- oder Wirtszellproteinen). Kurze Proteine werden bevorzugt unter Verwendung chemischer Peptidsynthese hergestellt.

[0008] Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung Antikörper bereit, welche die erfindungsgemäßen Fragmente erkennen, unter der Voraussetzung, dass die Erfindung in ihrem Geltungsbereich nicht Antikörper umfasst, welche eine von 446 vollständigen Proteinsequenzen in WO99/24578 erkennen. Die Antikörper können polyclonal oder vorzugsweise monoclonal sein und können mit beliebigen geeigneten Mitteln hergestellt werden.

[0009] Die Erfindung stellt auch Proteine bereit, umfassend Peptidsequenzen, welche durch diese Antikörper erkannt werden. Diese Peptidsequenzen schließen natürlich Fragmente der Neisseria-Proteine in WO99/24578 ein, sie umfassen aber auch Peptide, welche die antigene Struktur der Neisseria-Peptide imitieren, wenn sie an Immunglobulin gebunden sind.

[0010] Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung Nucleinsäuren bereit, welche die erfindungsgemäßen Fragmente und Proteine codieren, unter der Voraussetzung, dass die Erfindung innerhalb ihres Umfangs nicht Nucleinsäuren umfasst, welche eine der 446 Proteinsequenzen in WO99/24578 codieren.

[0011] Zusätzlich stellt die Erfindung Nucleinsäuren bereit, welche Sequenzen umfassen, die homolog zu diesen Sequenzen sind (d. h. mit Sequenzidentität dazu). Weiterhin stellt die Erfindung Nucleinsäuren bereit, welche an diese Sequenzen hybridisieren können, vorzugsweise unter Bedingungen „hoher Stringenz“ (z. B. 65°C in einer Lösung von 0,1 × SSC, 0,5% SDS).

[0012] Es sollte auch anerkannt werden, dass die Erfindung Nucleinsäuren bereitstellt, welche Sequenzen umfasst, die komplementär zu den vorstehend beschriebenen sind (z. B. zu Antisense- oder Sonden zwecken).

[0013] Erfindungsgemäße Nucleinsäuren können natürlich auf vielen Wegen hergestellt werden (z. B. durch

chemische Synthese, aus genomischen oder cDNA-Genbanken, aus dem Organismus selbst etc.) und können verschiedene Formen annehmen (z. B. Einzelstrang, Doppelstrang, Vektoren, Sonden etc.). Zusätzlich umfasst der Begriff „Nucleinsäure“ DNA und RNA und auch ihre Analoge wie jene, die ein modifiziertes Rückgrat enthalten, und auch Peptid-Nucleinsäuren (PNA) etc.

[0014] Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung Vektoren bereit, welche die erfindungsgemäßen Nucleotidsequenzen (z. B. Expressionsvektoren) umfassen, und Wirtszellen, die mit solchen Vektoren transformiert sind.

[0015] Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung Zusammensetzungen bereit, welche erfindungsgemäßes/n Protein, Antikörper und/oder Nucleinsäure enthalten. Diese Zusammensetzungen können zum Beispiel als Impfstoffe oder als diagnostische Reagenzien oder als immunogene Zusammensetzungen geeignet sein.

[0016] Die Erfindung stellt auch erfindungsgemäße Nucleinsäuren, Proteine oder Antikörper zur Verwendung als Medikamente (z. B. als Impfstoffe oder als immunogene Zusammensetzungen) oder als diagnostische Reagenzien bereit. Sie stellt auch die Verwendung von erfindungsgemäßen Nucleinsäuren, Proteinen oder Antikörpern bei der Herstellung von: (i) einem Medikament zur Behandlung oder Vorbeugung von Infektionen durch *Neisseria*-Bakterien, (ii) einem diagnostischen Reagens zum Nachweis der Anwesenheit von *Neisseria*-Bakterien oder von Antikörpern, die gegen *Neisseria*-Bakterien hervorgerufen wurden, und/oder (iii) einem Reagens, welches Antikörper gegen *Neisseria*-Bakterien hervorrufen kann, bereit. Die *Neisseria*-Bakterien können von einer/m beliebigen Art oder Stamm sein (wie *N. gonorrhoeae*), sie sind aber vorzugsweise *N. meningitidis*, insbesondere Stamm A oder Stamm B.

[0017] Eine Zusammenfassung der Standardtechniken und -verfahren, welche angewendet werden können, um die Erfindung auszuführen (z. B. um die offenbarten Sequenzen zur Impfung oder zu diagnostischen Zwecken zu verwenden) folgt. Diese Zusammenfassung ist keine Einschränkung der Erfindung, sondern gibt eher Beispiele an, die verwendet werden können, jedoch nicht erforderlich sind.

Allgemeines

[0018] In der Praxis verwendet die vorliegende Erfindung, wenn nicht anders angegeben, konventionelle Verfahren der Molekularbiologie, Mikrobiologie, rekombinanter DNA und der Immunologie, welche gemäß dem Stand der Technik sind. Solche Verfahren werden in der Literatur ausführlich erklärt z. B. Sambrook Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Zweite Auflage (1989), DNA Cloning, Bände I und II (D.N Glover Hrsg. 1985), Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait Hrsg., 1984), Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins Hrsg. 1984), Transcription and Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins Hrsg. 1984), Animal Cell Culture (R. I. Freshney Hrsg. 1986), Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986), B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984), die Serie Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.), insbesondere die Bände 154 & 155, Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. H. Miller und M. P. Calos, Hrsg., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory), Mayer und Walker, Hrsg. (1987), Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London), Scopes (1987) Protein Purification: Principles and Practice, Zweite Auflage (Springer-Verlag, N. Y.) und Handbook of Experimental Immunology, Bande I-IV (D. M. Weir und C. C. Blackwell, Hrsg. 1986).

[0019] Standardabkürzungen für Nucleotide und Aminosäuren werden in dieser Beschreibung verwendet.

[0020] Alle Veröffentlichungen, Patente und Patentanmeldungen, die hier zitiert werden, werden vollständig durch Bezugnahme eingebunden.

Definitionen

[0021] Eine X enthaltende Zusammensetzung ist „im Wesentlichen frei von“ Y, wenn mindestens 85 Gewichts-% des gesamten X + Y in der Zusammensetzung X ist. Vorzugsweise umfasst X mindestens etwa 90 Gewichts-% des gesamten X + Y in der Zusammensetzung, stärker bevorzugt mindestens etwa 95% oder sogar 99% Gewichts-%.

[0022] Der Begriff „umfassend“ bedeutet „einschließlich“ sowie „bestehend aus“, z. B. kann eine Zusammensetzung „umfassend“ X, ausschließlich aus X bestehen oder sie kann etwas zusätzlich zu X beinhalten, wie X + Y.

[0023] Der Begriff „antigene Determinante“ umfasst B-Zell-Epitope und T-Zell-Epitope.

[0024] Der Begriff „heterolog“ bezieht sich auf zwei biologische Komponenten, welche in der Natur nicht zusammen gefunden werden. Die Komponenten können Wirtszellen, Gene oder regulatorische Regionen wie Promotoren sein. Obwohl die heterologen Komponenten in der Natur nicht zusammen gefunden werden, können sie zusammen funktionieren, wie in dem Fall, wenn ein zu einem Gen heterologer Promoter funktionell mit einem Gen verknüpft ist. Ein anderes Beispiel ist, wenn eine Neisseria-Sequenz zu einer Maus-Wirtszelle heterolog ist. Ein weiteres Beispiel wären zwei Epitope von denselben oder verschiedenen Proteinen, welche in einem einzelnen Protein in einer Anordnung zusammengefügt wären, die in der Natur nicht gefunden wird.

[0025] Ein „Replikationsursprung“ ist eine Polynucleotidsequenz, welche die Replikation von Polynucleotiden initiiert und reguliert, wie ein Expressionsvektor. Der Replikationsursprung verhält sich wie eine autonome Einheit der Polynucleotid-Replikation innerhalb einer Zelle, die zur Replikation unter seiner eignen Kontrolle fähig ist. Ein Replikationsursprung kann für einen Vektor benötigt werden, um in einer bestimmten Wirtszelle zu replizieren. Mit bestimmten Replikationsursprüngen kann ein Expressionsvektor in einer hohen Kopienzahl in Gegenwart der geeigneten Proteine innerhalb der Zelle reproduziert werden. Beispiele für diese Ursprünge sind autonom replizierende Sequenzen, welche in Hefe wirksam sind, und das virale T-Antigen, das in COS-7-Zellen wirksam ist.

Expressionssysteme

[0026] Die Neisseria-Nucleotidsequenzen können in einer Vielfalt von verschiedenen Expressionssystemen exprimiert werden, zum Beispiel jene, die mit Säugerzellen, Baculoviren, Pflanzen, Bakterien und Hefe verwendet werden.

i Säugersysteme

[0027] Säuger-Expressionssysteme sind dem Fachmann bekannt. Ein Säugerpromotor ist eine beliebige DNA-Sequenz, welche in der Lage ist, an die Säuger-RNA-Polymerase zu binden und die stromabwärts gerichtete (3')-Transkription einer codierenden Sequenz (z. B. eines Strukturgens) in mRNA zu initiieren. Ein Promotor hat eine Transkriptions-Initiationsregion, welche üblicherweise in der Nähe des 5'-Endes der codierenden Sequenz liegt, und eine TATA-Box, welche sich üblicherweise 25-30 Basenpaare (Bp) stromaufwärts der Transkriptionsinitiationsstelle befindet. Von der TATA-Box wird angenommen, dass sie die RNA-Polymerase II dirigiert, die RNA-Synthese an der richtigen Stelle zu beginnen. Ein Säuger-Promotor enthält auch ein stromaufwärts gelegenes Promotorelement, das üblicherweise innerhalb von 100 bis 200 Bp stromaufwärts der TATA-Box liegt. Ein stromaufwärts gelegenes Promotorelement bestimmt die Geschwindigkeit, mit der die Transkription initiiert wird und kann in jeder Orientierung wirken [Sambrook et al. (1989) „Expression of cloned Genes in Mammalian Cells.“ In Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2te Auflage].

[0028] Virale Sänergene werden oft stark exprimiert und weisen einen breiten Wirtsbereich auf; daher stellen Sequenzen, welche die viralen Sänergene codieren, besonders nützliche Promotorsequenzen bereit. Beispiele umfassen den frühen SV40-Promotor, den Maus-Mammatumovirus-LTR-Promotor, den späten Adenovirus-Hauptpromotor (Ad MLP) und den Herpes simplex-Virus-Promotor. Zusätzlich stellen Sequenzen von nicht-viralen Genen wie das murine Metallothionein-Gen ebenfalls nützliche Promotorsequenzen bereit. Die Expression kann entweder konstitutiv oder reguliert (induzierbar) sein; abhängig vom Promotor kann sie in auf Hormon-reagierenden Zellen mit Glucocorticoid induziert werden.

[0029] Die Anwesenheit eines Enhancer-Elements (Enhancer), kombiniert mit den vorstehend beschriebenen Promotorelementen, erhöht üblicherweise die Expressionsspiegel. Ein Enhancer ist eine regulatorische DNA-Sequenz, welche die Transkription bis zu 1000-fach stimulieren kann, wenn sie mit homologen oder heterologen Promotoren verknüpft ist, wobei die Synthese an der normalen RNA-Startstelle beginnt. Enhancer sind auch aktiv, wenn sie stromaufwärts oder stromabwärts von der Transkriptionsinitiationsstelle in entweder normaler oder in umgekehrter Orientierung oder in einer Entfernung von mehr als 1000 Nucleotiden vom Promotor platziert werden [Maniatis et al. (1987) Science 236: 1237, Alberts et al. (1989) Molecular Biology of the Cell, 2te Auflage]. Enhancer-Elemente, die aus Viren stammen, können besonders nützlich sein, da sie üblicherweise ein breiteres Wirtsspektrum haben. Die Beispiele umfassen den frühen SV40-Gen-Enhancer [Dijkmans et al. (1985) EMBO J. 4: 761] und den Enhancer/Promotor aus der langen terminalen Wiederholung (LTR) des Rous-Sarcom-Virus [Gorman et al. (1982b) Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 6777] und aus dem menschlichen Cytomegalievirus [Boshart et al. (1985) Cell 41: 521]. Zusätzlich sind einige Enhancer regulierbar und werden nur in Gegenwart eines Induktors wie eines Hormons oder eines Metallions aktiv [Sassone-Corsi und Borelli

(1986) Trends Genet. 2: 215, Maniatis et al. (1987) Science 236: 1237].

[0030] Ein DNA-Molekül kann intrazellulär in Säugerzellen exprimiert werden. Eine Promotorsequenz kann direkt mit dem DNA-Molekül verknüpft werden, in welchen Fall die erste Aminosäure am N-Terminus des rekombinanten Proteins immer Methionin ist, welches durch das ATG-Startcodon codiert wird. Wenn gewünscht, kann der N-Terminus durch in vitro-Inkubation mit Cyanogenbromid von dem Protein geschnitten werden.

[0031] Alternativ können Fremdproteine auch durch die Erzeugung von chimären DNA-Molekülen, welche ein Fusionsprotein codieren, bestehend aus einem Leadersequenzfragment, welches die Sekretion des Fremdproteins in Säugerzellen gewährleistet, aus der Zelle in das Wachstumsmedium sekretiert werden. Vorzugsweise gibt es Prozessierungsstellen, welche zwischen dem Leaderfragment und dem Fremdgen codiert sind, die entweder in vivo oder in vitro gespalten werden können. Das Leadersequenzfragment codiert üblicherweise ein Signalpeptid, das aus hydrophoben Aminosäuren besteht, welches die Sekretion des Proteins aus der Zelle dirigieren. Die dreigeteilte Adenovirus-Leadersequenz ist ein Beispiel für eine Leadersequenz, welche die Sekretion eines Fremdproteins in Säugerzellen gewährleistet.

[0032] Üblicherweise sind die Transkriptionsterminations- und Polyadenylierungssequenzen, die durch Säugerzellen erkannt werden, regulatorische Regionen, die 3' des Translations-Stoppcodons liegen und daher zusammen mit den Promotor-Elementen die codierende Sequenz flankieren. Der 3'-Terminus der reifen mRNA wird durch ortsspezifische posttranskriptionelle Spaltung und Polyadenylierung gebildet [Birnstiel et al. (1985) Cell 41: 349, Proudfoot und Whitelaw (1988) "Termination and 3' end processing of eukaryotic RNA. In Transcription and splicing (Hrsg. B.D. Hames und D.M. Glover), Proudfoot (1989) Trends Biochem. Sci. 14: 105]. Diese Sequenzen dirigieren die Transkription einer mRNA, welche in ein durch die DNA codiertes Polypeptid translatiert werden kann. Beispiele für Transkriptionsterminations-/Polyadenylierungssignale umfassen solche, die von SV40 abgeleitet sind [Sambrook et al. (1989) „Expression of cloned genes in cultured mammalian cells.“ In Molecular Cloning: A Laboratory Manual.

[0033] Üblicherweise werden die vorstehend beschriebenen Komponenten, umfassend einen Promotor, ein Polyadenylierungssignal und eine Transkriptionsterminationssequenz, in Expressionskonstrukten zusammengesetzt. Enhancer, Introns mit funktionellen Donor- und Akzeptor-Spleißstellen und Leadersequenzen können ebenfalls in ein Expressionskonstrukt eingeschlossen werden, wenn gewünscht. Expressionskonstrukte sind oft in einem Replikon wie einem extrachromosomalen Element (z. B. Plasmide) erhalten, die zu einer stabilen Aufrechterhaltung in einem Wirt wie Säugerzellen oder Bakterien in der Lage sind. Replikationssysteme des Säugers umfassen jene von tierischen Viren, welche trans-wirkende Faktoren zur Replikation benötigen. Zum Beispiel replizieren Plasmide, enthaltend die Replikationssysteme von Papovavirus wie SV40 [Gluzman (1981) Cell 23: 175] oder Polyomavirus zu extrem hohen Kopienzahlen in Gegenwart des geeigneten viralen T-Antigens. Zusätzliche Beispiele für Säuger-Replikons umfassen jene von Rinder-Papillomvirus und Epstein-Barr-Virus. Zusätzlich kann das Replikon zwei Replikationssysteme haben, wodurch es ermöglicht wird, dass es zum Beispiel in Säugerzellen zur Expression und in einem prokaryotischen Wirt zur Clonierung und Amplifizierung aufrechterhalten wird. Beispiele für solche Säuger-Bakterien-Shuttlevektoren umfassen pMT2 [Kaufman et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9: 946] und pHEBO [Shimizu et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6: 1074].

[0034] Das verwendete Transformationsverfahren hängt vom zu transformierenden Wirt ab. Verfahren zu Einführung von heterologen Polynucleotiden in Säugerzellen sind dem Fachmann bekannt und umfassen Dextran-vermittelte Transfektion, Calciumphosphatpräzipitation, Polybren-vermittelte Transfektion, Protoplastenfusion, Elektroporation, Einschluß der/s Polynucleotide/s in Liposomen und eine direkte Mikroinjektion der DNA in Kerne.

[0035] Säugerzelllinien, die als Wirte zur Expression verfügbar sind, sind dem Fachmann bekannt und umfassen viele immortalisierte Zelllinien, die bei der American Type Culture Collection (ATCC) erhältlich sind, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Chinesische Hamsterovarzellen (CHO), HeLa-Zellen, Baby-Hamster-Nierenzellen (BHK), Affennierenzellen (COS), menschliche hepatozelluläre Karzinomzellen (z. B. Hep G2) und eine Anzahl anderer Zelllinien.

ii Baculovirus-Systeme

[0036] Das das Protein codierende Polynucleotid kann auch in einen geeigneten Insekten-Expressionsvektor eingefügt werden und ist funktionell mit den Kontrollelementen innerhalb dieses Vektors verknüpft. Die Vektorkonstruktion verwendet Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind. Im Allgemeinen umfassen die Komponenten des Expressionssystems einen Transfervektor, üblicherweise ein bakterielles Plasmid, welcher sowohl

ein Fragment des Baculovirusgenoms als auch eine geeignete Restriktionsstelle zum Einfügen des/r zu exprimierenden, heterologen Gens oder Gene enthält, einen Wildtyp-Baculovirus mit einer Sequenz, die homolog zum Baculovirus-spezifischen Fragment im Transfervektor ist (dies erlaubt die homologe Rekombination des heterologen Gens in das Baculovirus-Genom) und geeignete Insekten-Wirtszellen und Wachstumsmedien.

[0037] Nach dem Einfügen der das Protein codierenden DNA-Sequenz in den Transfervektor, werden der Vektor und das virale Wildtyp-Genom in eine Insektenwirtszelle transfiziert, wo dem Vektor und dem viralen Genom ermöglicht wird, zu rekombinieren. Der verpackte rekombinante Virus wird exprimiert und rekombinante Plaques werden identifiziert und gereinigt. Materialien und Verfahren zu Baculovirus/Insektenzell-Expressionssystemen sind in Form von Kits im Handel erhältlich, unter anderem von Invitrogen, San Diego KA („Max-Bac“-Kit). Diese Verfahren sind dem Fachmann allgemein bekannt und vollständig beschrieben bei Summers und Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin Nr. 1555 (1987) (im Folgenden „Summers und Smith“).

[0038] Vor dem Einfügen der das Protein codierenden DNA-Sequenz in das Baculovirus-Genom werden die vorstehend beschriebenen Komponenten, umfassend eine/n Promotor, Leadersequenz (wenn gewünscht), codierende Sequenz von Interesse und Transkriptionsterminationssequenz, üblicherweise in ein Übertragungs-Zwischenkonstrukt (Transfervektor) eingesetzt. Dieses Konstrukt kann ein einzelnes Gen und funktionell verknüpfte regulatorische Elemente, multiple Gene, jedes mit seinem eigenen Satz funktionell verknüpfter regulatorischer Elemente, oder multiple Gene, welche durch denselben Satz regulatorischer Elemente reguliert werden, enthalten. Übertragungs-Zwischenkonstrukte werden oft in einem Replikon, wie einem extrachromosomalen Element (z. B. Plasmide), welche zum stabilen Erhalt in einem Wirt wie einem Bakterium in der Lage sind, aufrechterhalten. Das Replikon hat ein Replikationssystem, wodurch ihm erlaubt wird, in einem geeigneten Wirt zur Clonierung und Amplifizierung aufrechterhalten zu werden.

[0039] Derzeit ist der am häufigsten verwendete Transfervektor zur Einführung fremder Gene in AcNPV pAc373. Viele andere dem Fachmann bekannte Vektoren wurden ebenfalls entworfen. Diese umfassen zum Beispiel pVL985 (welcher das Polyhedrin-Startcodon von ATG zu ATT ändert und welcher eine BamHI-Clonierungsstelle 32 Basenpaare stromabwärts von ATT einführt; vgl. Luckow und Summers, Virology (1989) 17: 31.

[0040] Das Plasmid enthält üblicherweise das Polyhedrin-Polyadenylierungssignal (Miller et al. (1988) Ann. Rev. Microbiol., 42: 177) und ein prokaryotisches Ampicillin-Resistenzgen (amp) und den Replikationsursprung zur Selektion und Vermehrung in *E. coli*.

[0041] Baculovirus-Transfektoren enthalten üblicherweise einen Baculovirus-Promotor. Ein Baculovirus-Promotor ist eine beliebige DNA-Sequenz, die in der Lage ist, eine Baculovirus-RNA-Polymerase zu binden und die stromabwärts (5' nach 3') gerichtete Transkription einer codierenden Sequenz (z. B. eines Strukturgens) in mRNA zu initiieren. Ein Promotor hat eine Transkriptions-Initiationsregion, welche üblicherweise in der Nähe des 5'-Endes der codierenden Sequenz liegt. Diese Transkriptions-Initiationsregion umfasst üblicherweise eine RNA-Polymerase-Bindungsstelle und eine Transkriptionsinitiationsstelle. Ein Baculovirus-Transfektor kann auch eine zweite Domäne, Enhancer genannt, haben, welche, wenn sie vorhanden ist, üblicherweise fern vom Strukturgen liegt. Die Expression kann entweder reguliert oder konstitutiv sein.

[0042] Strukturgene, die zum späten Zeitpunkt in einem viralen Infektionszyklus in hohem Maße transkribiert werden, stellen besonders nützliche Promotorsequenzen bereit. Beispiele umfassen Sequenzen, welche aus dem das virale Polyhedronprotein codierende Gen stammen, Friesen et al., (1986) „The Regulation of Baculovirus Gene Expression“ in: The Molecular Biology of Baculoviruses (Hrsg. Walter Doerfler), EPO-Veröffentlichungen Nr. 127 839 und 155 476, und aus dem p10-Proteincodierenden Gen stammen, Vlak et al., (1988), J. Gen. Virol. 69: 765.

[0043] Geeignete Signalsequenzen codierende DNA kann aus Genen für sekretierte Insekten- oder Baculovirusproteine stammen, wie das Baculovirus-Polyhedrin-Gen (Carbonell et al. (1988) Gene, 73: 409). Alternativ können Leadersequenzen aus Quellen, die nicht Insekten sind, wie solche aus Genen, die das menschliche α -Interferon codieren, Maeda et al., (1985), Nature 315: 592, die das menschliche Gastrin-freisetzende Peptid codieren, Lebacqz-Verheyden et al., (1988), Molec. Cell. Biol. 8: 3129, die das menschliche IL-2 codieren, Smith et al., (1985) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 82: 8404, Maus-IL-3, (Miyajima et al., (1987) Gene 58: 273 und die die menschliche Glucocerebrosidase codieren, Martin et al. (1988) DNA, 7: 99, auch verwendet werden, um die Sekretion in Insekten zu bewerkstelligen, da die Signale für die posttranslationalen Modifizierungen in Säugerzellen (wie die Spaltung des Signalpeptids, die proteolytische Spaltung und Phosphorylierung) in Insektenzellen erkannt zu werden scheinen und die Signale, welche für die Sekretion und die Kernakkumulierung

benötigt werden, ebenfalls zwischen Zellen von Wirbellosen und Zellen von Wirbeltieren konserviert zu sein scheinen.

[0044] Ein rekombinantes Polypeptid oder Polyprotein kann intrazellulär exprimiert werden oder, wenn es mit den richtigen regulatorischen Sequenzen exprimiert wird, kann es sekretiert werden. Eine gute intrazelluläre Expression von nicht-fusionierten Fremdproteinen erfordert üblicherweise heterologe Gene, welche idealerweise eine kurze Leadersequenz haben, die geeignete Translationsinitiationssignale vor einem ATG-Startcodon enthält. Wenn gewünscht, kann das Methionin durch in vitro-Inkubation mit Cyanogenbromid am N-Terminus von dem reifen Protein gespalten werden.

[0045] Alternativ können rekombinante Polyproteine oder Proteine, die natürlicherweise nicht sekretiert werden, durch Schaffung von chimären DNA-Molekülen, welche ein Fusionsprotein codieren, bestehend aus einem Leadersequenzfragment, welches die Sekretion des Fremdproteins in Insekten gewährleistet, aus der Insektenzelle sekretiert werden. Das Leadersequenzfragment codiert üblicherweise ein Signalpeptid, bestehend aus hydrophoben Aminosäuren, welches die Translokation des Proteins in das endoplasmatische Retikulum dirigiert.

[0046] Nach der Insertion der DNA-Sequenz und/oder des Gens, codierend den Expressionsprodukt-Vorläufer des Proteins, wird ein Insektenzellen-Wirt mit der heterologen DNA des Transfervektors und der genomischen DNA des Wildtyp-Baculovirus-üblicherweise durch Kotransfektion-kotransformiert. Der Promotor und die Transkriptionsterminationssequenz des Konstrukts umfassen üblicherweise einen 2-5 Kb-Abschnitt des Baculovirus-Genoms. Verfahren zur Einführung heterologer DNA in die gewünschte Stelle des Baculovirus sind dem Fachmann bekannt. (Vgl. Summers und Smith, vorstehend, Ju et al. (1987), Smith et al., Mol. Cell. Biol. (1983) 3: 2156 und Luckow und Summers (1989)). Zum Beispiel kann die Insertion in ein Gen wie das Polyhedrin-Gen durch homologe doppelte Crossover-Rekombination erfolgen; die Insertion kann auch in eine Restriktionsenzymstelle, die in das gewünschte Baculovirus-Gen konstruiert wurde, erfolgen. Miller et al., (1989), Bioessays 4: 91. Die DNA-Sequenz wird, wenn sie an die Stelle des Polyhedrin-Gens in den Expressionsvektor cloniert wird, von den sowohl 5'- als auch 3'-Polyhedrin-spezifischen Sequenzen flankiert und ist stromabwärts des Polyhedrin-Promotors positioniert.

[0047] Der neu gebildete Baculovirus-Expressionsvektor wird anschließend in ein infektiöses rekombinantes Baculovirus verpackt. Homologe Rekombination erfolgt in einer geringen Häufigkeit (zwischen etwa 1% und etwa 5%); daher ist die Mehrheit der nach Kotransfektion produzierten Viren immer noch das Wildtyp-Virus. Daher ist ein Verfahren notwendig, um die rekombinanten Viren zu identifizieren. Ein Vorteil des Expressionssystems ist eine visuelle Durchmusterung, welche die Unterscheidung der rekombinanten Viren erlaubt. Das Polyhedrin-Protein, welches vom nativen Virus produziert wird, wird auf sehr hohem Niveau in den Kernen infizierter Zellen zu späten Zeitpunkten nach der viralen Infektion produziert. Das akkumulierte Polyhedrin-Protein bildet Einschlusskörper, welche auch eingebettete Partikel enthalten. Diese Einschlusskörper, von einer Größe bis zu 15 µm, sind hochgradig lichtbrechend, was ihnen eine hell leuchtende Erscheinung verleiht, die unter dem Lichtmikroskop leicht sichtbar wird. Zellen, die mit rekombinanten Viren infiziert sind, fehlen diese Einschlusskörper. Um rekombinantes Virus vom Wildtyp-Virus zu unterscheiden, wird der Überstand der Transfektion mittels dem Fachmann bekannter Verfahren auf einen einzellige Schicht von Insektenzellen ausgebracht. Die Plaques werden nämlich unter dem Lichtmikroskop auf Anwesenheit (hinweisend auf das Wildtyp-Virus) oder Abwesenheit (hinweisend auf rekombinantes Virus) von Einschlusskörpern durchmustert. „Current Protocols in Microbiology“ Bd. 2 (Ausubel et al. Hrsg.) bei 16.8 (Erg. 10, 1990), Summer und Smith, vorstehend, Miller et al. (1989).

[0048] Rekombinante Baculovirus-Expressionsvektoren wurden zur Infektion in einige Insektenzellen entwickelt. Zum Beispiel wurden rekombinante Baculoviren entwickelt, unter anderem für: *Aedes aegypti*, *Auto-graphs californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* und *Trichoplusia ni* (WO 89/046699, Carbonell et al., (1985) J. Virol. 56: 153, Wright (1986) Nature 321: 718, Smith et al., (1983) Mol. Cell. Biol. 3: 2156 und vgl. allgemein Fraser et al. (1989) In Vitro Cell. Dev. Biol. 25: 225).

[0049] Zellen und Zellkulturmedien sind im Handel sowohl für die direkte als auch für die Fusionsexpression von heterologen Polypeptiden in einem Baculovirus-Expressionssystem erhältlich; die Zellkulturverfahren sind dem Fachmann allgemein bekannt. Vgl. z. B. Summers und Smith vorstehend.

[0050] Die modifizierten Insektenzellen können dann in einem geeigneten Nährmedium gezüchtet werden, was eine stabile Aufrechterhaltung der/s im modifizierten Insektenwirt vorhandenen Plasmide/s erlaubt. Wenn das Gen des Expressionsprodukts unter einer induzierbaren Kontrolle steht, kann der Wirt zu einer hohen

Dichte gezüchtet und die Expression induziert werden. Alternativ wird, wenn die Expression konstitutiv ist, das Produkt kontinuierlich in das Medium exprimiert und das Nährmedium muss kontinuierlich zirkuliert werden, während das interessierende Produkt entfernt wird und aufgebrauchte Nährstoffe angereichert werden. Das Produkt kann durch solche Verfahren wie Chromatographie, z. B. HPLC, Affinitätschromatographie, Ionenaustauschchromatographie etc., Elektrophorese, Dichtegradientenzentrifugation, Lösungsmittelextraktion oder Ähnliches gereinigt werden. Soweit erforderlich kann das Produkt weiter gereinigt werden, wenn es notwendig ist, so dass im Wesentlichen jegliche Insektenproteine entfernt werden, welche auch in das Medium sekretiert werden oder aus der Lyse der Insektenzellen entstehen, so dass ein Produkt bereitgestellt wird, welches mindestens im Wesentlichen frei von Wirtszellresten ist, z. B. Proteinen, Lipiden und Polysacchariden.

[0051] Um Proteinexpression zu erhalten, werden rekombinante Wirtszellen, die von den Transformanten stammen, unter Bedingungen inkubiert, welche die Expression der das rekombinante Protein codierenden Sequenz erlauben. Die Bedingungen variieren abhängig von der ausgewählten Wirtszelle. Die Bedingungen sind basierend auf dem Stand der Technik durch den Fachmann leicht ermittelbar.

iii. Pflanzensysteme

[0052] Es gibt viele im Fachgebiet bekannte genetische Expressionssysteme mit Pflanzenzellkulturen und mit ganzen Pflanzen. Beispielhafte zelluläre genetische Pflanzen-Expressionssysteme umfassen solche, die in den Patenten wie US 5,693,506, US 5,659,122 und US 5,608,143 beschrieben werden. Zusätzliche Beispiele für genetische Expression in Pflanzenzellkulturen wurden von Zenk, *Phytochemistry* 30: 3861-3863 (1991) beschrieben. Beschreibungen von Signalpeptiden von Pflanzenproteinen können zusätzlich zu den vorstehend beschriebenen Literaturzitaten in Vaulcombe et al., *Mol. Gen. Genet.* 209: 33-40 (1987), Chandler et al., *Plant Molecular Biology* 3: 407-418 (1984), Rogers, J. *Biol. Chem.* 260: 3731-3738 (1985), Rothstein et al., *Gene* 55: 353-356 (1987), Whittier et al., *Nucleic Acids Research* 15: 2515-2535 (1987), Wirsal et al., *Molecular Microbiology* 3: 3-14 (1989), Yu et al., *Gene* 122: 247-253 (1992) gefunden werden. Eine Beschreibung der Regulation der Pflanzengen-Expression durch das Phytohormon Gibberellinsäure und durch von Gibberellinsäure induzierte sekretierte Enzyme kann bei R.L. Jones und J. MacMillin, *Gibberellins*: in: *Advanced Plant Physiology*, Malcom B. Wilkins, Hrsg. 1984, Pitman Publishing Limited, London, S. 21-52, gefunden werden. Literaturzitate, welche andere metabolisch regulierte Gene beschreiben: Sheen, *Plant Cell*, 2: 1027-1038 (1990), Maas et al., *EMBO J.* 9: 3447-3452 (1990), Senkel und Hickey, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 1337-1339 (1987).

[0053] Typischerweise wird unter Verwendung von Verfahren gemäß dem Stand der Technik eine gewünschte Polynucleotidsequenz in eine Expressionskassette, umfassend genetische regulatorische Elemente, die für das Funktionieren in Pflanzen entworfen wurden, eingefügt. Die Expressionskassette wird in den gewünschten Expressionsvektor mit Begleitsequenzen stromaufwärts und stromabwärts der Expressionskassette, die zur Expression in einem Pflanzenwirt geeignet sind, eingefügt. Die Begleitsequenzen stammen von einem Plasmid oder sind viralen Ursprungs und stellen dem Vektor notwendige Eigenschaften bereit, um den Vektoren zu erlauben, DNA von einem ursprünglichen Clonierungswirt wie Bakterien zu einem gewünschten Pflanzenwirt zu übertragen. Das bakterielle/pflanzliche Basisvektorkonstrukt stellt vorzugsweise einen prokaryontischen Replikationsursprung mit einem breiten Wirtsbereich, einen prokaryontischen selektierbaren Marker und für Transformationen mit Agrobakterium T-DNA-Sequenzen für den durch Agrobakterium vermittelten Transfer in Pflanzenchromosomen bereit. Wenn das heterologe Gen für den Nachweis nicht leicht zugänglich ist, hat das Konstrukt vorzugsweise auch ein selektierbares Markergen, das geeignet ist, um zu bestimmen, ob eine Pflanzenzelle transformiert wurde. Ein allgemeiner Übersichtsartikel über geeignete Marker, zum Beispiel für die Mitglieder der Grasfamilie („grass family“), ist bei Wilkink und Dons, 1993, *Plant Mol. Biol. Repr.*, 11(2): 165-185, zu finden.

[0054] Sequenzen, die geeignet sind, um die Integration der heterologen Sequenz in das Pflanzengenom zu ermöglichen, werden ebenfalls empfohlen. Diese können Transposon-Sequenzen und Ähnliche zur homologen Rekombination sowie Ti-Sequenzen umfassen, welche eine zufällige Insertion einer heterologen Expressionskassette in ein Pflanzengenom ermöglichen. Geeignete prokaryontische selektierbare Marker umfassen eine Resistenz gegen Antibiotika wie Ampicillin oder Tetracyclin. Andere, zusätzliche Funktionen codierende DNA-Sequenzen können ebenfalls im Vektor vorhanden sein, wie es im Fachgebiet bekannt ist.

[0055] Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können in einer Expressionskassette zur Expression des/r interessierenden Proteins/e enthalten sein. Üblicherweise wird es nur eine Expressionskassette geben, obwohl zwei oder mehr möglich sind. Die rekombinante Expressionskassette enthält zusätzlich zu der das heterologe Protein codierenden Sequenz die folgenden Elemente: eine Promotor-Region, pflanzliche nicht-translatierte 5'-Sequenzen, Initiationscodon, abhängig davon, ob das Strukturgen mit einem ausgestattet ist oder

nicht, und eine Transkriptions- und Translations-Terminationssequenz. Einzigartige Restriktionsenzymstellen an den 5'- und 3'-Enden der Kassette erlauben eine leichte Insertion in einen bereits existierenden Vektor.

[0056] Eine heterologe Sequenz kann ein beliebiges mit der Erfindung in Beziehung stehendes Protein codieren. Die das interessierende Protein codierende Sequenz codiert ein Signalpeptid, welches die Prozessierung und Translokation des Proteins, je nach Erfordernis, ermöglicht, und üblicherweise ohne eine Sequenz ist, die zur Bindung des gewünschten erfindungsgemäßen Proteins an eine Membran führt. Da meistens die Transkriptions-Initiationsregion für ein Gen zuständig ist, welches während der Keimung exprimiert und transloziert wird, kann man durch Anwendung eines Signalpeptids, welches die Translokation ermöglicht, auch die Translokation des interessierenden Proteins ermöglichen. Auf diesem Weg wird/werden das/die interessierende/n Protein/e aus den Zellen ausgeschleust, in denen sie exprimiert werden, und können effizient geerntet werden. Typischerweise erfolgt die Sekretion in Samen über die Aleuron- oder Skutella-Epithelschicht in das Endosperm des Samens. Während es nicht notwendig ist, dass das Protein aus den Zellen sekretiert wird, in denen das Protein produziert wird, erleichtert dies die Isolierung und Reinigung des rekombinanten Proteins.

[0057] Da die letztendliche Expression des gewünschten Genprodukts in einer eukaryontischen Zelle sein wird, ist es wünschenswert, zu bestimmen, ob ein Teil des clonierten Gens Sequenzen enthält, die als Introns durch die Splicosom-Maschinerie des Wirts prozessiert werden. Wenn dem so ist, kann ortsspezifische Mutagenese der „Intron-Region“ durchgeführt werden, um zu verhindern, dass ein Teil der genetischen Information als ein falscher Intron-Code verloren geht, Reed und Maniatis, Cell 41: 95-105, 1985.

[0058] Der Vektor kann unter Verwendung von Mikropipetten direkt in Pflanzenzellen mikroinjiziert werden, um die rekombinante DNA mechanisch zu übertragen. Crossway, Mol. Gen. Genet. 202: 179-185, 1985. Das genetische Material kann auch unter Verwendung von Polyethylenglycol in die Pflanze übertragen werden, Krens et al., Nature, 296, 72-74, 1982. Ein anderes Verfahren zur Einführung von Nucleinsäureabschnitten ist die ballistische Hochgeschwindigkeitspenetration durch kleine Partikel mit der Nucleinsäure entweder innerhalb der Matrix von kleinen Kügelchen oder Partikeln oder auf der Oberfläche, Klein et al., Nature, 327, 70-73, 1987 und Knudsen und Muller, 1991, Planta, 185: 330-336, welche einen Partikel-Beschuß von Gersten-Endosperm aufzeigen, um transgene Gerste zu erzeugen. Noch ein anderes Verfahren zur Einführung wäre die Fusion von Protoplasten mit anderen Einheiten, entweder Minizellen, Zellen, Lysosomen oder anderen fusionierbaren Körpern mit Lipid-Oberfläche, Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1859-1863, 1982.

[0059] Der Vektor kann auch durch Elektroporation in die Pflanzenzellen eingeführt werden. (Fromm et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5824, 1985). In diesem Verfahren werden Pflanzenprotoplasten in Gegenwart von Plasmiden, welche das Genkonstrukt enthalten, einer Elektroporation unterzogen. Elektrische Impulse einer hohen Feldstärke permeabilisieren Biomembranen reversibel, was die Einführung von Plasmiden ermöglicht. Durch Elektroporation behandelte Pflanzenprotoplasten bilden die Zellwand neu, teilen sich und bilden einen Pflanzenkallus.

[0060] Alle Pflanzen, von denen Protoplasten isoliert und gezüchtet werden können, um ganze regenerierte Pflanzen zu bilden, können durch die vorliegende Erfindung transformiert werden, so dass ganze Pflanzen, welche das übertragene Gen enthalten, erhalten werden. Es ist bekannt, dass praktisch alle Pflanzen aus gezüchteten Zellen oder Geweben, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf alle hauptsächlichen Arten von Zuckerrohr, Zuckerrübe, Baumwolle, Obst- und andere Bäume, Hülsenfrüchte und Gemüse, regeneriert werden können. Einige geeignete Pflanzen umfassen zum Beispiel Arten der Gattung *Fragaria*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Vigna*, *Citrus*, *Linum*, *Geranium*, *Manihot*, *Daucus*, *Arabidopsis*, *Brassica*, *Raphanus*, *Sinapis*, *Atropa*, *Capsicum*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Lycopersion*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Petunia*, *Digitalis*, *Majorans*, *Cichorium*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Bromus*, *Asparagus*, *Antirrhinum*, *Hererocallis*, *Nemesia*, *Pelargonium*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Ranunculus*, *Senecio*, *Salpiglossis*, *Cucumis*, *Browaalia*, *Glycine*, *Lolium*, *Zea*, *Triticum*, *Sorghum* und *Datura*.

[0061] Mittel zur Regeneration variieren von Pflanzenart zu Pflanzenart, aber im Allgemeinen wird zunächst eine Suspension transformierter Protoplasten, welche Kopien des heterologen Gens enthalten, bereitgestellt. Kallusgewebe wird gebildet und Schösslinge können vom Kallus induziert und anschließend bewurzelt werden. Alternativ kann aus der Protoplastensuspension eine Embryobildung induziert werden. Diese Embryonen keimen als natürliche Embryonen, so dass Pflanzen gebildet werden. Die Kulturmedien enthalten im Allgemeinen verschiedene Aminosäuren und Hormone wie Auxin und Cytokinine. Es ist auch vorteilhaft, dem Medium Glutaminsäure und Prolin hinzuzufügen, insbesondere für solche Arten wie Mais und Alfalfa. Schösslinge und Wurzeln entwickeln sich normalerweise gleichzeitig. Eine effiziente Regeneration hängt vom Medium, vom Genotyp und von der Entwicklung der Kultur ab. Wenn diese drei Variablen kontrolliert werden, wird die Regene-

ration vollständig reproduzierbar und wiederholbar.

[0062] In einigen Pflanzenzell-Kultursystemen kann das gewünschte erfindungsgemäße Protein ausgeschieden werden oder alternativ kann das Protein aus der gesamten Pflanze extrahiert werden. Wenn das gewünschte erfindungsgemäße Protein in das Medium ausgeschieden wird, kann es gesammelt werden. Alternativ können die Embryonen und embryonenlosen Hälften der Samen oder andere Pflanzengewebe mechanisch zerkleinert werden, um jegliche ausgeschiedenen Proteine zwischen Zellen und Geweben freizusetzen. Das Gemisch kann in einer Pufferlösung suspendiert werden, um die löslichen Proteine zu erhalten. Konventionelle Verfahren zur Proteinisolierung- und -reinigung werden dann verwendet, um das rekombinante Protein zu reinigen. Die Parameter Zeit, Temperatur, pH-Wert, Sauerstoff und Volumen werden mittels Routineverfahren angepasst, um die Expression und die Gewinnung des heterologen Proteins zu optimieren.

iv. Bakterielle Systeme

[0063] Bakterielle Expressionsverfahren sind im Fachgebiet bekannt. Ein bakterieller Promotor ist eine beliebige DNA-Sequenz, die in der Lage ist, bakterielle RNA-Polymerase zu binden und die Stromabwärts (3')-Transkription einer codierenden Sequenz (z. B. eines Strukturgens) in mRNA zu initiieren. Ein Promotor hat eine Transkriptions-Initiationsregion, welche üblicherweise proximal dem 5'-Ende der codierenden Sequenz liegt. Die Transkriptions-Initiationsregion umfasst üblicherweise eine RNA-Polymerase-Bindungsstelle und eine Transkriptions-Initiationsstelle. Ein bakterieller Promotor kann auch eine zweite Domäne haben, genannt ein Operator, der mit einer angrenzenden RNA-Polymerase-Bindungsstelle überlappen kann, bei der die RNA-Synthese beginnt. Der Operator ermöglicht eine negativ regulierte (induzierbare) Transkription, da ein Genrepressorprotein den Operator binden und dadurch die Transkription eines spezifischen Gens hemmen kann. Die konstitutive Expression kann in Abwesenheit negativer regulatorischer Elemente wie dem Operator auftreten. Zusätzlich kann eine positive Regulation durch eine Gen-Aktivatorprotein-Bindungssequenz erreicht werden, welche, wenn sie vorhanden ist, üblicherweise proximal (5') der RNA-Polymerase-Bindungssequenz ist. Ein Beispiel für ein Gen-Aktivatorprotein ist das Katabolit-Aktivatorprotein (CAP), welches dabei hilft, die Transkription des lac-Operons in *Escherichia coli* (*E. coli*) zu initiieren [Raibaud et al. (1984) *Annu. Rev. Genet.* 18: 173]. Die regulierte Expression kann daher entweder positiv oder negativ sein, wodurch die Transkription entweder verstärkt oder verringert wird.

[0064] Sequenzen, welche Enzyme der Stoffwechselwege codieren, stellen besonders nützliche Promotorsequenzen bereit. Beispiele umfassen Promotorsequenzen von Enzymen, die Zucker wie Galactose, Lactose (lac) [Chang et al. (1977) *Nature* 198: 1056] und Maltose metabolisieren. Zusätzliche Beispiele umfassen Promotorsequenzen von biosynthetischen Enzymen wie Tryptophan (trp) [Goeddel et al. (1980) *Nucl. Acids Res.* 8: 4057, Yelverton et al. (1981) *Nucl. Acids Res.* 9: 731, US-Patent 4,738,921, EP-A-0036776 und EP-A-0121775]. Das g-lactamase (bla)-Promotorsystem [Weissmann (1981) „The cloning of Interferon and other mistakes.“ In *Interferon 3* (Hrsg. I. Gresser)], die Promotorsysteme Bacteriophage Lambda PL [Shimatake et al. (1981) *Nature* 292: 128] und T5 [US-Patent 4,689,406] stellen ebenfalls nützliche Promotorsequenzen bereit.

[0065] Zusätzlich fungieren synthetische Promotoren, die nicht in der Natur vorkommen, ebenfalls als bakterielle Promotoren. Zum Beispiel können Transkriptions-Aktivierungssequenzen eines bakteriellen oder Bacteriophagen-Promotors mit den Operonsequenzen eines anderen bakteriellen oder Bacteriophagen-Promotors verknüpft werden, so dass ein synthetischer Hybridpromotor geschaffen wird [US-Patent 4,551,433]. Zum Beispiel ist der tac-Promotor ein hybrider trp-lac-Promotor, umfassend sowohl die trp-Promotor- als auch die lac-Operon-Sequenzen, welcher durch den lac-Repressor reguliert wird [Amann et al. (1983) *Gene* 25: 167; de Boer et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 21]. Weiterhin kann ein bakterieller Promotor natürlich vorkommende Promotoren nicht-bakteriellen Ursprungs umfassen, welche die Fähigkeit haben, bakterielle RNA-Polymerase zu binden und die Transkription zu initiieren. Ein natürlich vorkommender Promotor nicht-bakteriellen Ursprungs kann auch mit einer kompatiblen RNA-Polymerase verknüpft werden, um hohe Expressionsspiegel einiger Gene in Prokaryonten zu produzieren. Das Bacteriophagen-T7-RNA-Polymerase-/Promotorsystem ist ein Beispiel für ein gekoppeltes Promotorsystem [Studier et al. (1986) *J. Mol. Biol.* 189: 113, Tabor et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 1074]. Zusätzlich kann ein Hybridpromotor ebenfalls aus einem Bacteriophagenpromotor und einer *E. coli*-Operator-Region bestehen (EPO-A-0 267 851).

[0066] Zusätzlich zu einer funktionierenden Promotorsequenz ist eine wirksame Ribosomenbindungsstelle ebenfalls für die Expression fremder Gene in Prokaryonten nützlich. In *E. coli* wird die Ribosomenbindungsstelle Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz genannt und umfasst ein Initiationscodon (ATG) und eine 3-9 Nucleotide lange Sequenz, welche 3-11 Nucleotide stromaufwärts des Initiationscodons liegt [Shine et al. (1975) *Nature*

254: 34]. Von der SD-Sequenz wird angenommen, dass sie die Bindung von mRNA an das Ribosom durch Paarung der Basen zwischen der SD-Sequenz und dem 3'-Ende der 16S rRNA von *E. coli* fördert. [Steitz et al. (1979) „Genetic Signals and nucleotide sequences in messenger RNA.“ In *Biological Regulation and Development: Gene Expression* (Hrsg. R.F. Goldberger)]. Um eukaryontische Gene und prokaryontische Gene mit einer schwachen Ribosomenbindungsstelle zu exprimieren [Sambrook et al. (1989) „Expression of cloned genes in *Escherichia coli*.“ In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*].

[0067] Ein DNA-Molekül kann intrazellulär exprimiert werden. Eine Promotorsequenz kann direkt mit dem DNA-Molekül verknüpft werden, in welchem Fall die erste Aminosäure am N-Terminus immer ein Methionin sein wird, welches durch das ATG-Startcodon codiert wird. Wenn gewünscht, kann das Methionin am N-Terminus durch in vitro-Inkubation mit Cyanogenbromid oder durch in vivo oder in vitro-Inkubation mit einer bakteriellen Methionin-N-terminalen Peptidase von dem Protein abgespalten werden (EPO-A-0 219 237).

[0068] Fusionsproteine stellen eine Alternative zur direkten Expression bereit. Üblicherweise wird eine DNA-Sequenz, codierend den N-terminalen Anteil eines endogenen bakteriellen Proteins oder eines anderen stabilen Proteins an das 5'-Ende heterologer codierender Sequenzen fusioniert. Nach Expression stellt dieses Konstrukt eine Fusion der beiden Aminosäuresequenzen bereit. Zum Beispiel kann das Bakteriophagen-Lambda-Zellgen an das 5'-Ende eines Fremdproteins geknüpft und in Bakterien exprimiert werden. Das entstehende Fusionsprotein behält vorzugsweise eine Stelle für ein Prozessierungsenzym (Faktor Xa) bei, um das Bakteriophagenprotein von dem Fremdgen abzuspalten [Nagai et al. (1984) *Nature* 309: 810]. Fusionsproteine können auch mit Sequenzen aus dem lacZ-[Jia et al. (1987) *Gene* 60: 197], dem trpE-[Allen et al. (1987) *J. Biotechnol.* 5: 93, Makoff et al. (1989) *J. Gen Microbiol.* 135: 11] und dem Chey-Gen [EP-A-0 324 647] hergestellt werden. Die DNA-Sequenz an der Verknüpfungsstelle der beiden Aminosäuresequenzen kann eine spaltbare Stelle codieren oder nicht. Ein anderes Beispiel ist ein Ubiquitin-Fusionsprotein. Ein solches Fusionsprotein wird mit der Ubiquitinregion hergestellt, welche vorzugsweise eine Stelle für ein prozessierendes Enzym beibehält (z. B. eine Ubiquitin-spezifische prozessierende Protease), um das Ubiquitin vom Fremdprotein abzuspalten. Mit diesem Verfahren kann daher ein natives Fremdprotein isoliert werden [Miller et al. (1989) *Bio/Technology* 7: 698].

[0069] Alternativ können Fremdproteine auch durch die Erzeugung von chimären DNA-Molekülen, welche ein Fusionsprotein codieren, welches aus einem Signalpeptidsequenzfragment besteht, das die Sekretion des Fremdproteins in Bakterien ermöglicht, aus der Zelle sekretiert werden [US-Patent 4,336,336]. Das Signalsequenzfragment codiert üblicherweise ein Signalpeptid, bestehend aus hydrophoben Aminosäuren, welche die Sekretion des Proteins aus der Zelle dirigieren. Das Protein wird entweder in das Wachstumsmedium (Gram-positive Bakterien) oder in den periplasmatischen Raum, der zwischen der inneren und der äußeren Membran der Zelle liegt (Gram-negative Bakterien), sekretiert. Vorzugsweise gibt es Prozessierungsstellen, welche entweder in vivo oder in vitro gespalten werden können und zwischen dem Signalpeptidfragment und dem Fremdgen codiert sind.

[0070] Geeignete Signalsequenzen codierende DNA kann von Genen für sekretierte bakterielle Proteine wie das äußere Membranprotein von *E. coli* (ompA) [Masui et al. (1983) in: *Experimental Manipulation of Gene Expression*, Ghayeb et al. (1984) *EMBO J.* 3: 2437] und die Signalsequenz der alkalischen Phosphatase von *E. coli* (phoA) [Oka et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci* 82: 7212] abgeleitet werden. Als ein zusätzliches Beispiel kann die Signalsequenz des alpha-Amylasegens von verschiedenen *Bacillus*-Stämmen verwendet werden, um heterologe Proteine von *B. subtilis* zu sekretieren [Palva et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5582, EP-A-0 244 042].

[0071] Üblicherweise sind Transkriptions-Terminationssequenzen, welche von Bakterien erkannt werden, regulatorische Regionen, die 3' des Translations-Stoppcodons liegen und daher zusammen mit dem Promotor die codierende Sequenz flankieren. Diese Sequenzen dirigieren die Transkription einer mRNA, welche in ein durch die DNA codiertes Polypeptid translatiert werden kann. Transkriptionsterminationssequenzen umfassen häufig DNA-Sequenzen von etwa 50 Nucleotiden, die in der Lage sind, Stammschleifenstrukturen zu bilden, welche bei der Termination der Transkription helfen. Beispiele umfassen Transkriptionsterminationssequenzen, die aus Genen mit starken Promotoren abgeleitet sind, wie das trp-Gen in *E. coli* sowie andere biosynthetische Gene.

[0072] Üblicherweise werden die vorstehend beschriebenen Komponenten, umfassend einen Promotor, eine Signalsequenz (wenn gewünscht), eine codierende interessierende Sequenz und eine Transkriptionsterminationssequenz, in Expressionskonstrukten zusammengesetzt. Expressionskonstrukte werden oft in einem Replikon aufrechterhalten, wie einem extrachromosomalen Element (z. B. Plasmide), das in einem Wirt wie Bak-

terien stabil aufrechterhalten werden kann. Das Replikon hat ein Replikationssysteme, wodurch es ihm ermöglicht wird, dass es in einem prokaryontischen Wirt entweder zur Expression oder zur Clonierung und Amplifizierung aufrechterhalten wird. Zusätzlich kann ein Replikon ein Plasmid mit entweder einer hohen oder einer niedrigen Kopienzahl sein. Ein Plasmid mit einer hohen Kopienzahl hat im Allgemeinen eine Kopienzahl im Bereich von etwa 5 bis etwa 200 und üblicherweise etwa 10 bis etwa 150. Ein Wirt, der ein Plasmid mit einer hohen Kopienzahl enthält, hat vorzugsweise mindestens etwa 10 und stärker bevorzugt mindestens etwa 20 Plasmide. Es kann entweder ein Vektor mit einer hohen oder mit einer niedrigen Kopienzahl ausgewählt werden, abhängig von der Wirkung des Vektors und des Fremdproteins auf den Wirt.

[0073] Alternativ können die Expressionskonstrukte mit einem integrierenden Vektor in das bakterielle Genom integriert werden. Integrierende Vektoren enthalten üblicherweise mindestens eine Sequenz, die homolog zum Bakterienchromosom ist, was die Integration des Vektors ermöglicht. Integrationen scheinen aus Rekombinationen zwischen homologer DNA im Vektor und dem Bakterienchromosom zu entstehen. Zum Beispiel integrieren Integrationsvektoren, die mit DNA von verschiedenen *Bacillus*-Stämmen konstruiert wurden, in das *Bacillus*-Chromosom (EP-A-O 127 328). Integrierende Vektoren können auch aus Bakteriophagen- oder Transposonsequenzen bestehen.

[0074] Üblicherweise können extrachromosomale und integrierende Expressionskonstrukte selektierbare Marker enthalten, um die Selektion von Bakterienstämmen, die transformiert wurden, zu ermöglichen. Selektierbare Marker können im bakteriellen Wirt exprimiert werden und können Gene umfassen, welche Bakterien Resistenz gegen Wirkstoffe wie Ampicillin, Chloramphenicol, Erythromycin, Kanamycin (Neomycin) und Tetracyclin verleihen [Davies et al. (1978) *Annu. Rev. Microbiol.* 32: 469]. Selektierbare Marker können auch biosynthetische Gene umfassen, wie solche in den biosynthetischen Histidin-, Tryptophan- und Leucinstoffwechselwegen.

[0075] Alternativ können einige der vorstehend beschriebenen Komponenten in Transformationsvektoren zusammengesetzt werden. Transformationsvektoren umfassen üblicherweise einen selektierbaren Marker, der entweder in einem Replikon aufrechterhalten wird oder in einen integrierenden Vektor entwickelt wird, wie vorstehend beschrieben.

[0076] Expressions- und Transformationsvektoren, entweder extrachromosomale Replikons oder integrierende Vektoren, wurden zur Transformation in viele Bakterien entwickelt. Zum Beispiel wurden Expressionsvektoren unter anderem für folgende Bakterien entwickelt: *Bacillus subtilis* [Palva et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5582, EP-A-O 036 259 und EP-A-O 063 953, WO 84/04541], *Escherichia coli* [Shimatake et al. (1981) *Nature* 292: 128, Amann et al. (1985) *Gene* 40: 183, Studier et al. (1986) *J. Mol. Biol.* 189: 113, EP-A-O 036 776, EP-A-O 136 829 und EP-A-O 136 907], *Streptococcus cremoris* [Powell et al. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 655], *Streptococcus lividans* [Powell et al. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 655], *Streptomyces lividans* [US Patent 4,745,056].

[0077] Verfahren zu Einführung exogener DNA in bakterielle Wirte sind dem Fachmann wohlbekannt und umfassen üblicherweise entweder die Transformation von Bakterien, die mit CaCl_2 oder anderen Mitteln behandelt wurden, wie divalente Kationen und DMSO. DNA kann auch durch Elektroporation in bakterielle Zellen eingeführt werden. Die Transformationsverfahren variieren üblicherweise mit den zu transformierenden Bakterienarten. Vgl. z. B. [Masson et al. (1989) *FEMS Microbiol. Lett.* 60: 273, Palva et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5582, EP-A-O 036 259 und EP-A-O 063 953, WO 84/04541, *Bacillus*], [Miller et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 856, Wang et al. (1990) *J. Bacteriol.* 172: 949, *Campylobacter*], [Cohen et al. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69: 2110, Dower et al. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16: 6127, Kushner (1978) "An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids. In *Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering* (Hrsg. H.W. Boyer und S. Nicosia), Mandel et al. (1970) *J. Mol. Biol.* 53: 159, Taketo (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 949: 318, *Escherichia*], [Chassy et al. (1987) *FEMS Microbiol. Lett.* 44: 173 *Lactobacillus*], [Fiedler et al. (1988) *Anal. Biochem.* 170: 38, *Pseudomonas*], [Augustin et al. (1990) *FEMS Microbiol. Lett.* 66: 203, *Staphylococcus*], [Barany et al. (1980) *J. Bacteriol.* 144: 698, Harlander (1987) "Transformation of *Streptococcus lactis* by electroporation", in: *Streptococcal Genetics* (Hrsg. J. Ferretti und R. Curtiss III), Perry et al. (1981) *Infect. Immun.* 32: 1295, Powell et al. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 655, Somkuti et al. (1987) *Proc. 4th Eur. Cong. Biotechnology* 1: 412, *Streptococcus*].

v. Hefe-Expression

[0078] Hefe-Expressionssysteme sind dem Fachmann ebenfalls bekannt. Ein Hefepromotor ist eine beliebige DNA-Sequenz, die in der Lage ist, Hefe-RNA-Polymerase zu binden und die Stromabwärts (3')-Transkription

einer codierenden Sequenz (z. B. eines Strukturgens) in mRNA zu initiieren. Ein Promotor hat eine Transkriptions-Initiationsregion, welche üblicherweise proximal dem 5'-Ende der codierenden Sequenz liegt. Die Transkriptions-Initiationsregion umfasst üblicherweise eine RNA-Polymerase-Bindungsstelle (die „TATA-Box“) und eine Transkriptionsinitiationsstelle. Ein Hefe-Promotor kann auch eine zweite Domäne haben, genannt eine stromaufwärts gelegene Aktivatorsequenz (UAS), welche, sofern vorhanden, üblicherweise distal des Strukturgens liegt. Die UAS ermöglicht die regulierte (induzierbare) Expression. Die konstitutive Expression findet in Abwesenheit einer UAS statt. Die regulierte Expression kann daher entweder positiv oder negativ sein, wodurch die Transkription entweder verstärkt oder verringert wird.

[0079] Hefe ist ein Gärungsorganismus mit einem aktiven Stoffwechselweg; daher stellen Sequenzen, welche Enzyme im Stoffwechselweg codieren, besonders nützliche Promotorsequenzen bereit. Beispiele umfassen Alkohol-Dehydrogenase (ADH) (EP-A-0 284 044), Enolase, Glucokinase, Glucose-6-Phosphat-Isomerase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAP oder GAPDH), Hexokinase, Phosphofructokinase, 3-Phosphoglyceratmutase und Pyruvatkinase (PyK) (EPO-A-0 329 203). Das Hefe-PHO5-Gen, codierend saure Phosphatase, stellt ebenfalls nützliche Promotorsequenzen bereit [Myanohara et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1].

[0080] Zusätzlich fungieren synthetische Promotoren, welche in der Natur nicht vorkommen, ebenfalls als Hefepromotoren. Zum Beispiel können UAS-Sequenzen des einen Hefe-Promotors mit der Transkriptionsaktivierungsregion eines anderen Hefepromotors verknüpft werden, so dass ein synthetischer Hybridpromotor geschaffen wird. Beispiele für solche Hybridpromotoren umfassen die regulatorische ADH-Sequenz, die mit der GAP-Transkriptionsaktivierungsregion verknüpft ist (US-Patente Nr. 4,876,197 und 4,880,734). Andere Beispiele für Hybridpromotoren umfassen Promotoren, welche aus den regulatorischen Sequenzen von entweder ADH2-, GAL4-, GAL10- oder PHO5-Genen bestehen, kombiniert mit der Transkriptionsaktivierungsregion eines glycolytischen Enzymgens wie GAP oder PyK (EP-A-0 164 556). Weiterhin kann ein Hefepromotor natürlich vorkommende Promotoren aus einer Quelle, die nicht Hefe ist, umfassen, welche die Fähigkeit haben, Hefe-RNA-Polymerase zu binden und die Transkription zu initiieren. Beispiele für solche Promotoren umfassen unter anderem [Cohen et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 1078, Henikoff et al. (1981) Nature 283: 835, Hollenberg et al. (1981) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 96: 119, Hollenberg et al. (1979) „The Expression of Bacterial Antibiotic Resistance Genes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*“ in: Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance (Hrsg. K.N. Timmis und A. Puhler), Mercerau-Puigalon et al. (1980) Gene 11: 163, Panthier et al. (1980) Curr. Genet. 2: 109].

[0081] Ein DNA-Molekül kann in Hefe intrazellulär exprimiert werden. Eine Promotorsequenz kann direkt mit dem DNA-Molekül verknüpft werden, in welchem Fall die erste Aminosäure am N-Terminus des rekombinanten Proteins immer ein Methionin ist, welches durch das ATG-Startcodon codiert wird. Wenn gewünscht, kann Methionin am N-Terminus durch in vitro-Inkubation mit Cyanogenbromid vom Protein abgespalten werden.

[0082] Fusionsproteine stellen eine Alternative zu Hefe-Expressionssystemen sowie Säuger-, Baculovirus- und bakteriellen Expressionssystemen bereit. Üblicherweise ist eine DNA-Sequenz, codierend den N-terminalen Anteil eines endogenen Hefeproteins oder eines anderen stabilen Proteins, an das 5'-Ende von heterologen codierenden Sequenzen fusioniert. Nach Expression stellt dieses Konstrukt eine Fusion der beiden Aminosäuresequenzen bereit. Zum Beispiel kann das Hefe- oder menschliche Superoxid-Dismutase (SOD)-Gen an das 5'-Ende eines Fremdgens geknüpft und in Hefe exprimiert werden. Die DNA-Sequenz an der Verknüpfungsstelle der beiden Aminosäuresequenzen kann eine spaltbare Stelle codieren oder auch nicht. Vgl. z. B. EP-A-0 196 056. Ein anderes Beispiel ist ein Ubiquitin-Fusionsprotein. Ein solches Fusionsprotein wird mit der Ubiquitinregion hergestellt, welche vorzugsweise eine Stelle für ein prozessierendes Enzym beibehält (z. B. eine Ubiquitin-spezifische prozessierende Protease), um das Ubiquitin vom Fremdprotein abzuspalten. Mit diesem Verfahren kann daher ein natives Fremdprotein isoliert werden (z. B. WO88/024066).

[0083] Alternativ können Fremdproteine auch durch die Erzeugung von chimären DNA-Molekülen, welche ein Fusionsprotein codieren, das ein Leadersequenzfragment umfasst, welches die Sekretion des Fremdproteins in der Hefe ermöglicht, von der Zelle in das Wachstumsmedium ausgeschieden werden. Vorzugsweise gibt es zwischen dem Leaderfragment und dem Fremdgen codierte Prozessierungsstellen, welche in vivo oder in vitro gespalten werden können. Das Leadersequenzfragment codiert üblicherweise ein Signalpeptid mit hydrophoben Aminosäuren, welche die Sekretion des Proteins aus der Zelle leiten.

[0084] Geeignete Signalsequenzen codierende DNA kann von Genen für sekretierte Hefeproteine wie dem Hefe-Invertasegen (EP-A-0 012 873, JPO.62,096,086) und dem A-Faktor-Gen (US-Patent 4,588,684) abgeleitet werden. Alternativ existieren Leadersequenzen mit Ursprung nicht aus Hefe wie die Interferon-Leaderse-

quenz, die auch die Sekretion in Hefe ermöglichen (EP-A-0 060 057).

[0085] Eine bevorzugte Klasse von Sekretionsleadersequenzen sind solche, die ein Fragment des Hefe-alpha-Faktor-Gens verwenden, welches eine „Prä“-Signalsequenz und eine „Pro“-Region enthält. Die Typen von alpha-Faktor-Fragmenten, welche angewendet werden können, umfassen die Prä-Pro-alpha-Faktor-Leadersequenzen in voller Länge (etwa 83 Aminosäurereste) sowie verkürzte alpha-Faktor-Leadersequenzen (üblicherweise etwa 25 bis etwa 50 Aminosäurereste) (US-Patente 4,546,083 und 4,870,008, EP-A-0 324 274). Zusätzliche Leadersequenzen mit einem alpha-Faktor-Leaderfragment, welches die Sekretion ermöglicht, umfassen hybride alpha-Faktor-Leadersequenzen, welche mit einer Prä-Sequenz einer ersten Hefe, aber einer Pro-Region aus einem zweiten Hefe-alpha-Faktor hergestellt werden. (z. B. vgl. WO 89/02463.)

[0086] Üblicherweise sind Transkriptions-Terminationssequenzen, die durch Hefe erkannt werden, regulatorische Regionen, die 3' des Translations-Stoppcodons gelegen sind, und sie flankieren daher zusammen mit dem Promotor die codierende Sequenz. Diese Sequenzen leiten die Transkription einer mRNA, welche in das durch die DNA codierte Polypeptid translatiert werden kann. Beispiele für Transkriptionsterminatorsequenzen und andere durch Hefe erkannte Terminationssequenzen sind solche, die glycolytische Enzyme codieren.

[0087] Üblicherweise werden die vorstehend beschriebenen Komponenten, umfassend einen Promotor, eine Leadersequenz (wenn gewünscht), eine codierende interessierende Sequenz und eine Transkriptionsterminationssequenz, in Expressionskonstrukten zusammengesetzt. Expressionskonstrukte werden oft in einem Replikon aufrechterhalten, wie einem extrachromosomalen Element (z. B. Plasmide), das in einem Wirt wie eine Hefe oder Bakterien stabil aufrechterhalten werden kann. Das Replikon kann zwei Replikationssysteme haben, wodurch ermöglicht wird, dass es zum Beispiel in Hefe zur Expression und in einem prokaryontischen Wirt zur Clonierung und Amplifizierung aufrechterhalten wird. Beispiele für solche Hefe-Bakterien-Shuttle-Vektoren umfassen YEp24 [Botstein et al. (1979) *Gene* 8: 17-24], pCI/1 [Brake et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4642-4646] und YRp17 [Stinchcomb et al. (1982) *J. Mol. Biol.* 158: 157]. Zusätzlich kann ein Replikon ein Plasmid mit entweder einer hohen oder einer niedrigen Kopienzahl sein. Ein Plasmid mit einer hohen Kopienzahl hat im Allgemeinen eine Kopienzahl im Bereich von etwa 5 bis etwa 200 und üblicherweise etwa 10 bis etwa 150. Ein Wirt, der ein Plasmid mit einer hohen Kopienzahl enthält, hat vorzugsweise mindestens etwa 10 und stärker bevorzugt mindestens etwa 20. Ein Vektor mit einer hohen oder einer niedrigen Kopienzahl kann ausgewählt werden, abhängig von der Wirkung des Vektors und des Fremdproteins auf den Wirt. Vgl. z. B. Brake et al., vorstehend.

[0088] Alternativ können die Expressionskonstrukte mit einem integrierenden Vektor in das Hefegenom integriert werden. Integrierende Vektoren enthalten üblicherweise mindestens eine Sequenz, die homolog zum Hefechromosom ist, was die Integration des Vektors ermöglicht, und vorzugsweise zwei homologe Sequenzen, die das Expressionskonstrukt flankieren. Integrationen scheinen aus Rekombinationen zwischen homologer DNA im Vektor und dem Hefechromosom zu entstehen [Orr-Weaver et al. (1983) *Methods in Enzymol.* 101: 228-245]. Ein integrierender Vektor kann zu einem spezifischen Ort in der Hefe durch Auswahl der geeigneten homologen Sequenz zum Einschluss in den Vektor geleitet werden. Vgl. Orr-Weaver et al., vorstehend. Ein oder mehrere Expressionskonstrukte können integrieren, wodurch die Spiegel des produzierten rekombinanten Proteins beeinflusst werden [Rine et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 6750]. Die im Vektor eingeschlossenen chromosomalen Sequenzen können entweder als ein einzelnes Segment im Vektor vorkommen, was zur Integration des gesamten Vektors führt, oder als zwei Segmente, die homolog zu den angrenzenden Segmenten im Chromosom sind und das Expressionskonstrukt im Vektor flankieren, was zu einer stabilen Integration von ausschließlich Expressionskonstrukt führen kann.

[0089] Üblicherweise können extrachromosomale und integrierende Expressionskonstrukte selektierbare Marker enthalten, um die Selektion von Hefestämmen, die transformiert wurden, zu ermöglichen. Selektierbare Marker können biosynthetische Gene, welche in Hefewirten wie ADE2, HIS4, LEU2, TRP1 und ALG7 exprimiert werden können, und das G418-Resistenzgen umfassen, welches den Hefezellen Resistenz gegen Tunicamycin beziehungsweise G418 verleiht. Zusätzlich kann ein geeigneter selektierbarer Marker auch Hefen die Fähigkeit verleihen, in Gegenwart von toxischen Verbindungen wie Metall zu wachsen. Zum Beispiel ermöglicht das Vorhandensein von CUP1 der Hefe, in Gegenwart von Kupferionen zu wachsen [Butt et al. (1987) *Microbiol. Rev.* 51: 351].

[0090] Alternativ können einige der vorstehend beschriebenen Komponenten in Transformationsvektoren zusammengesetzt werden. Transformationsvektoren bestehen üblicherweise aus einem selektierbaren Marker, der entweder in einem Replikon aufrechterhalten oder in einen integrierenden Vektor entwickelt wird, wie vorstehend beschrieben.

[0091] Expressions- und Transformationsvektoren, entweder extrachromosomale Replikons oder integrierende Vektoren, wurden zur Transformation in viele Hefen entwickelt. Zum Beispiel wurden Expressionsvektoren unter anderem für die folgenden Hefen entwickelt: *Candida albicans* [Kurtz et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6: 142], *Candida maltosa* [Kunze et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25: 141], *Hansenula polymorpha* [Gleeson et al. (1986) J. Gen. Microbiol. 132: 3459, Roggenkamp et al. (1986) Mol. Gen. Genet. 202: 302], *Kluyveromyces fragilis* [Das et al. (1984) J. Bacteriol. 158: 1165], *Kluyveromyces lactis* [De Louvencourt et al. (1983) J. Bacteriol. 154: 737, Van den Berg et al. (1990) Bio/Technology 8: 135], *Pichia guilliermondii* [Kunze et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25: 141], *Pichia pastoris* [Cregg et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5: 3376, US-Patente Nr. 4,837,148 und 4,929,555], *Saccharomyces cerevisiae* [Hinnen et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929, Ito et al. (1983) J.

[0092] Bacteriol. 153: 163], *Schizosaccharomyces pombe* [Beach und Nurse (1981) Nature 300: 706] und *Yarrowia lipolytica* [Davidow et al. (1985) Curr. Genet. 10: 380471 Gaillardin et al. (1985) Curr. Genet. 10: 49].

[0093] Verfahren zu Einführung exogener DNA in Hefe-Wirte sind dem Fachmann wohlbekannt und umfassen üblicherweise entweder die Transformation von Sphäroplasten oder von intakten Hefezellen, die mit Alkali-Kationen behandelt wurden. Die Transformationsverfahren variieren üblicherweise mit den zu transformierenden Hefearten. Vgl. z. B. [Kurtz et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6: 142, Kunze et al. (1985), J. Basic Microbiol. 25: 141, *Candida*], [Gleeson et al. (1986) J. Gen. Microbiol. 132: 3459, Roggenkamp et al. (1986) Mol. Gen. Genet. 202: 302, *Hansenula*], [Das et al. (1984) J. Bacteriol. 158: 1165, De Louvencourt et al. (1983) J. Bacteriol. 154: 1165, Van den Berg et al. (1990) Bio/Technology 8: 135, *Kluyveromyces*], [Cregg et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5: 3376, Kunze et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25: 141, US-Patente Nr. 4,837,148 und 4,929,555, *Pichia*], [Hinnen et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929, Ito et al. (1983) J. Bacteriol. 153: 163, *Saccharomyces*], [Beach und Nurse (1981) Nature 300: 706, *Schizosaccharomyces*], [Davidow et al. (1985) Curr. Genet. 10: 39, Gaillardin et al. (1985) Curr. Genet. 10: 49, *Yarrowia*].

Antikörper

[0094] Wie er hier gebraucht wird, bezieht sich der Begriff „Antikörper“ auf ein Polypeptid oder eine Gruppe von Polypeptiden, die aus mindestens einer Antikörperkombinationsstelle zusammengesetzt sind. Eine „Antikörperkombinationsstelle“ ist der dreidimensionale Bindungsraum mit einer internen Oberflächenform und einer Ladungsverteilung, die komplementär zu den Eigenschaften eines Epitops eines Antigens sind, was eine Bindung des Antikörpers mit dem Antigen ermöglicht. „Antikörper“ umfasst zum Beispiel Wirbeltier-Antikörper, Hybridantikörper, chimäre Antikörper, humanisierte Antikörper, veränderte Antikörper, univalente Antikörper, Fab-Proteine und Einzeldomänen-Antikörper.

[0095] Antikörper gegen die erfindungsgemäßen Proteine sind für Affinitätschromatographie, Immuntests und zur Unterscheidung/Identifizierung von *Neisseria*-Proteinen nützlich.

[0096] Antikörper gegen erfindungsgemäße Proteine, sowohl polyclonal als auch monoclonal, können mit konventionellen Verfahren hergestellt werden. Im Allgemeinen wird das Protein zuerst verwendet, um ein geeignetes Tier zu immunisieren, vorzugsweise eine Maus, eine Ratte, ein Kaninchen oder eine Ziege. Kaninchen und Ziegen werden für die Herstellung polyclonaler Seren aufgrund des Volumens des Serums, das erhalten werden kann, und der Verfügbarkeit von markierten Anti-Kaninchen- und Anti-Ziege-Antikörpern bevorzugt. Die Immunisierung wird im Allgemeinen durch Mischen oder Emulgieren des Proteins in physiologischer Salzlösung, vorzugsweise in einem Adjuvans wie komplettem Freundschem Adjuvans und parenterale Injektion des Gemischs oder der Emulsion (im Allgemeinen subcutan oder intramuskulär) durchgeführt. Eine Dosis von 50-200 µg/Injektion ist typischerweise ausreichend. Die Immunisierung wird im Allgemeinen 2-6 Wochen später mit einer oder mehreren Injektionen des Proteins in physiologischer Salzlösung, vorzugsweise unter Verwendung von in komplettem Freundschem Adjuvans, verstärkt. Alternativ kann man Antikörper unter Verwendung von dem Fachmann bekannter Verfahren durch in vitro-Immunisierung erzeugen, was zum Zwecke dieser Erfindung als gleichwertig zur in vivo-Immunisierung angesehen wird. Polyclonale Antiseren werden durch Blutabnahme von dem immunisierten Tier und Überführung in einen Glas- oder Kunststoffbehälter, Inkubation des Blutes bei 25°C für eine Stunde, gefolgt von Inkubation bei 4°C für 2-18 Stunden, erhalten. Das Serum wird durch Zentrifugation (z. B. 1.000 g für 10 Minuten) gewonnen. Pro Blutung können etwa 20-50 ml aus Kaninchen erhalten werden.

[0097] Monoclonale Antikörper werden unter Anwendung des Standardverfahrens von Köhler und Milstein [Nature (1975) 256: 495-96] oder einer Modifikation davon hergestellt. Typischerweise wird eine Maus oder eine Ratte wie vorstehend beschrieben, immunisiert. Allerdings wird anstatt dem Tier Blut zu entnehmen, um

das Serum zu extrahieren, die Milz (und wahlweise einige große Lymphknoten) entfernt und in Einzelzellen dissoziiert. Wenn gewünscht, können die Milzzellen durch Aufbringung einer Zellsuspension auf eine Platte oder eine Vertiefung, die mit dem Proteinantigen beschichtet sind, durchmustert werden (nach Entfernen der unspezifischen adhären Zellen). B-Zellen, die Membran-gebundenes Immunglobulin, das spezifisch für das Antigen ist, exprimieren, binden an die Platte und werden nicht mit dem Rest der Suspension abgespült. Die daraus erhaltenen B-Zellen oder alle dissoziierte Milzzellen werden dann zu Fusion mit Myelomzellen induziert, um Hybridome zu bilden, und werden in einem Selektivmedium gezüchtet (z. B. Hypoxanthin-, Aminopterin-, Thymidin-Medium, „HAT“). Die entstehenden Hybridome werden durch limitierende Verdünnung ausplattiert und werden auf die Produktion von Antikörpern untersucht, welche spezifisch an das immunisierende Antigen binden (und welche nicht an unverwandte Antigene binden). Die ausgewählten mAk-sekretierenden Hybridome werden dann entweder in vitro (z. B. in Gewebekulturflaschen oder in Hohlfaserreaktoren) oder in vivo (wie Aszites in Mäusen) gezüchtet.

[0098] Wenn gewünscht, können die Antikörper (entweder polyclonal oder monoclonal) unter Verwendung konventioneller Verfahren markiert werden. Geeignete Markierungen umfassen Fluorophore, Chromophore, radioaktive Atome (insbesondere ^{32}P und ^{125}J), elektronendichte Reagenzien, Enzyme und Liganden mit spezifischen Bindungspartnern. Enzyme werden typischerweise durch ihre Aktivität nachgewiesen. Zum Beispiel wird die Meerrettichperoxidase üblicherweise aufgrund ihrer Fähigkeit, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in ein blaues Pigment umzuwandeln, nachgewiesen, das mit einem Spektrophotometer quantifizierbar ist. „Spezifischer Bindungspartner“ bezieht sich auf ein Protein, das in der Lage ist, ein Ligandenmolekül mit hoher Spezifität zu binden, wie zum Beispiel im Fall eines Antigens und eines dafür spezifischen monoclonalen Antikörpers. Andere spezifische Bindungspartner umfassen Biotin und Avidin oder Streptavidin, IgG und Protein A und die vielfältigen Rezeptor-Liganden-Paare, die dem Fachmann bekannt sind. Es versteht sich, dass die vorstehende Beschreibung nicht so gemeint ist, dass die verschiedenen Markierungen in bestimmte Klassen kategorisiert werden, da dieselbe Markierung in mehreren verschiedenen Anwendungen dienen kann. Zum Beispiel kann ^{125}J als radioaktive Markierung oder als elektronendichtes Reagens dienen.

[0099] HRP kann als Enzym oder als Antigen für einen mAk dienen. Weiterhin kann man verschiedene Markierungen für die gewünschte Wirkung kombinieren. Zum Beispiel erfordern mAk und Avidin auch Markierungen in der Praxis dieser Erfindung: daher kann man einen mAk mit Biotin markieren und seine Anwesenheit mit Avidin, das mit ^{125}J markiert ist, oder mit einem anti-Biotin-mAk, markiert mit HRP, nachweisen. Andere Permutationen und Möglichkeiten sind dem Fachmann leicht offensichtlich und werden innerhalb des Umfangs der Erfindung als gleichwertig angesehen.

Arzneimittel

[0100] Arzneimittel können entweder erfindungsgemäße Polypeptide, Antikörper oder Nucleinsäuren umfassen. Die Arzneimittel umfassen eine therapeutisch wirksame Menge von entweder Polypeptiden, Antikörpern oder Polynucleotiden gemäß der beanspruchten Erfindung.

[0101] Der Begriff „therapeutisch wirksame Menge“, wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf eine Menge eines therapeutischen Mittels zur Behandlung, Linderung oder Vorbeugung einer gewünschten Erkrankung oder eines Krankheitszustands oder um eine nachweisbare therapeutische oder vorbeugende Wirkung zu erzielen. Die Wirkung kann zum Beispiel durch chemische Markierungen oder Antigenspiegel nachgewiesen werden. Therapeutische Wirkungen umfassen auch eine Senkung von körperlichen Symptomen wie eine verringerte Körpertemperatur. Die genaue wirksame Menge für ein Individuum hängt von der Größe und dem Gesundheitszustand des Individuums, der Art und des Ausmaßes des Krankheitszustands und der Therapeutika oder der Kombination von Therapeutika, die zur Verabreichung ausgewählt wurden, ab. Daher ist es nicht von Nutzen, eine genaue wirksame Menge im Voraus festzulegen. Die wirksame Menge für eine bestimmte Situation kann jedoch durch Routineexperimente bestimmt werden und unterliegt der Beurteilung durch den Kliniker.

[0102] Zum Zwecke der vorliegenden Erfindung liegt eine wirksamen Dosis im Bereich von etwa 0,01 mg/kg bis 50 mg/kg oder 0,05 mg/kg bis etwa 10 mg/kg der DNA-Konstrukte im Individuum, an das sie verabreicht wird.

[0103] Ein Arzneimittel kann auch einen pharmazeutisch verträglichen Träger enthalten. Der Begriff „pharmazeutisch verträglicher Träger“ bezieht sich auf einen Träger zur Verabreichung eines therapeutischen Agens wie Antikörper oder eines Polypeptids, Gene oder anderer therapeutischer Agenzien. Der Begriff bezieht sich auf beliebige pharmazeutische Träger, welche nicht selbst die Herstellung von Antikörpern induzieren, die für das die Zusammensetzung erhaltende Individuum schädlich sein können, und welche ohne übermäßige Toxi-

zität verabreicht werden können. Geeignete Träger können große, langsam metabolisierte Makromoleküle wie Proteine, Polysaccharide, Polymilchsäuren, Polyglycolsäuren, polymere Aminosäuren, Aminosäurecopolymere und inaktive Viruspartikel sein. Solche Träger sind dem Fachmann wohlbekannt.

[0104] Pharmazeutisch verträgliche Salze können darin verwendet werden, zum Beispiel Mineralsäuresalze wie Hydrochloride, Hydrobromide, Phosphate, Sulfate und Ähnliche und die Salze von organischen Säuren wie Acetate, Propionate, Malonate, Benzoate und Ähnliche. Eine ausführliche Diskussion der pharmazeutisch verträglichen Excipienten ist in Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991) verfügbar.

[0105] Pharmazeutisch verträgliche Träger in therapeutischen Zusammensetzungen können Flüssigkeiten wie Wasser, physiologische Salzlösung, Glycerin und Ethanol enthalten. Zusätzlich können Hilfssubstanzen wie feuchtigkeitsspendende oder emulgierende Agenzien, pH-puffernde Substanzen und Ähnliche in solchen Vehikeln vorhanden sein. Typischerweise werden die therapeutischen Zusammensetzungen als Injektionslösungen hergestellt, entweder als flüssige Lösungen oder Suspensionen; feste Formen, die zur Lösung in oder Suspension in flüssigen Vehikeln vor der Injektion geeignet sind, können ebenfalls hergestellt werden. Liposomen sind in der Definition eines pharmazeutisch verträglichen Trägers eingeschlossen.

Verfahren zur Verabreichung

[0106] Sobald sie einmal zubereitet wurden, können die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen dem Individuum direkt verabreicht werden. Die zu behandelnden Individuen können Tiere sein; insbesondere können menschliche Individuen behandelt werden.

[0107] Die direkte Verabreichung der Zusammensetzungen wird im Allgemeinen durch Injektion erreicht, entweder subcutan, intraperitoneal, intravenös oder intramuskulär, oder sie werden in das Interstitium eines Gewebes verabreicht. Die Zusammensetzungen können auch in eine Läsion verabreicht werden. Andere Verfahren der Verabreichung umfassen orale und pulmonale Verabreichung, Zäpfchen und transdermale oder transcutane Anwendungen (vgl. z. B. WO98/20734), Nadeln und Genpistolen oder Hyposprays. Das Behandlungsdosisschema kann ein Einzeldosis- oder Mehrfachdosizeitplan sein.

Impfstoffe

[0108] Erfindungsgemäße Impfstoffe können entweder prophylaktisch (d. h. zur Verhinderung einer Infektion) oder therapeutisch (d. h. zur Behandlung einer Erkrankung nach einer Infektion) sein.

[0109] Solche Impfstoffe umfassen das/die immunisierende/n Antigen(e), Immunogen(e), Polypeptid(e), Protein(e) oder Nucleinsäure, üblicherweise in Kombination mit „pharmazeutisch verträglichen Trägern“, welche beliebige Träger umfassen, die nicht selbst die Herstellung von Antikörpern induzieren, die für das die Zusammensetzung erhaltende Individuum schädlich sein können. Geeignete Träger können typischerweise große, langsam metabolisierte Makromoleküle wie Proteine, Polysaccharide, Polymilchsäuren, Polyglycolsäuren, polymere Aminosäuren, Aminosäurecopolymere, Lipidaggregate (wie Öltröpfchen oder Liposomen) und inaktive Viruspartikel sein. Solche Träger sind dem Fachmann wohlbekannt. Zusätzlich können diese Träger als immunstimulierende Agenzien („Adjuvantien“) fungieren. Weiterhin kann das Antigen oder Immunogen mit einem bakteriellen Toxoid wie ein Toxoid von Diphtherie-, Tetanus-, Cholera-, H. pylori-Pathogenen etc. konjugiert sein.

[0110] Bevorzugte Adjuvantien zur Verstärkung der Wirksamkeit der Zusammensetzung umfassen, sind jedoch nicht begrenzt auf: (1) Aluminiumsalze (Alaun) wie Aluminiumhydroxid, Aluminiumphosphat, Aluminiumsulfat etc., (2) Öl-in-Wasser-Emulsionszubereitungen (mit oder ohne andere spezifische immunstimulierende Agenzien wie Muramylpeptide (vgl. nachstehend) oder Bakterienzellwandkomponenten) wie zum Beispiel (a) MF59™ (WO 90/14837, Kapitel 10 in Vaccine design: the subunit and adjuvant approach, Hrsg. Powell & Newman, Plenum Press 1995), enthaltend 5% Squalen, 0,5% Tween 80 und 0,5% Span 85 (optional verschiedene Mengen von MTP-PE enthaltend (vgl. nachstehend), jedoch nicht notwendig), zubereitet unter Verwendung eines Microfluidizers wie Model 110Y-Microfluidizer (Microfluidics, Newton, MA) in Submikron-Partikel, (b) SAF, enthaltend 10% Squalen, 0,4% Tween 80 und 5% Pluronic-blockiertes Polymer L121 und thr-MDP (vgl. nachstehend), entweder in eine Submikron-Emulsion microfluidisiert oder verwirbelt, um eine Emulsion mit größeren Partikeln zu erzeugen, und (c) Ribi™-Adjuvans-System (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT), enthaltend 2% Squalen, 0,2% Tween 80 und ein oder mehrere Bakterienzellwand-Komponenten aus der Gruppe, bestehend aus Monophosphorylipid A (MPL), Trehalosedimycolat (TDM) und Zellwandskelett (CWS), vorzugsweise MPL + CWS (Detox™), (3) Saponin-Adjuvantien wie Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester,

MA) können verwendet werden, oder Partikel, die daraus erzeugt wurden, wie ISCOMs (immunstimulierende Komplexe), (4) Komplettes Freundesches Adjuvans (CFA) und inkomplettes Freundesches Adjuvans (IFA), (5) Cytokine wie Interleukine (z. B. IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 etc.), Interferone (z. B. gamma-Interferon), Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF), Tumor-Nekrosefaktor (TNF) etc. und (6) andere Substanzen, welche als immunstimulierende Agenzien wirken, so dass die Wirksamkeit der Zusammensetzung verstärkt wird. Alaun und MF59TM werden bevorzugt.

[0111] Wie vorstehend erwähnt, umfassen Muramylpeptide, ohne darauf beschränkt zu sein, N-Acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamin (thr-MDP), N-Acetyl-normuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (nor-MDP), N-Acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamyl-L-alanin-2-(1'-2'-dipalmitoyl-sn-glycerin-3-hydroxyphosphoryloxy)-ethylamin (MTP-PE) etc.

[0112] Die immunogenen Zusammensetzungen (z. B. das immunisierende Antigen/Immunogen/Polypeptid/Protein/Nucleinsäure, pharmazeutisch verträglicher Träger und Adjuvans) enthalten typischerweise Verdünnungsmittel wie Wasser, physiologische Salzlösung, Glycerin, Ethanol etc.. Zusätzlich können Hilfssubstanzen wie feuchtigkeitsspendende oder emulgierende Agenzien, pH-puffernde Substanzen und Ähnliche in solchen Trägern vorhanden sein.

[0113] Typischerweise werden die immunogenen Zusammensetzungen zur Injektion entweder als flüssige Lösungen oder Suspensionen hergestellt; feste Formen, geeignet zur Lösung oder Suspension in flüssigen Trägern vor der Injektion können ebenfalls hergestellt werden. Die Zubereitung kann für eine verstärkten Adjuvans-Wirkung auch emulgiert oder in Liposomen eingeschlossen werden, wie vorstehend unter pharmazeutisch verträglichen Trägern diskutiert wurde.

[0114] Als Impfstoffe verwendete immunogene Zusammensetzungen umfassen eine immunologisch wirksame Menge der antigenen oder immunogenen Polypeptide sowie eine beliebige andere der vorstehend erwähnten Komponenten, wie es benötigt wird. Mit „immunologisch wirksamer Menge“ wird gemeint, dass die Verabreichung dieser Menge an ein Individuum entweder in einer Einzeldosis oder als Teil einer Serie für die Behandlung oder Vorbeugung wirksam ist. Diese Menge variiert, abhängig vom Gesundheitszustand und dem körperlichen Zustand des zu behandelnden Individuums, von der taxonomischen Gruppe des zu behandelnden Individuums (z. B. nicht-menschlicher Primat, Primat etc.), der Fähigkeit des Immunsystems des Individuums, Antikörper zu synthetisieren, vom gewünschten Grad an Schutz, von der Zubereitung des Impfstoffs, der Beurteilung des behandelnden Arztes der medizinischen Situation oder anderen relevanten Faktoren. Es wird erwartet, dass die Menge innerhalb eines relativ breiten Bereichs liegt, der mit Routinestudien bestimmt werden kann.

[0115] Die immunogenen Zusammensetzungen werden konventionell parenteral verabreicht, z. B. durch Injektion, entweder subcutan, intramuskulär oder transdermal/transcutan (z. B. WO98/20734). Zusätzliche Zubereitungen, die für andere Arten der Verabreichung geeignet sind, umfassen orale und pulmonale Zubereitungen, Zäpfchen und transdermale Anwendungen. Das Behandlungsdosischema kann ein Einzeldosis- oder Mehrfachdosiszeitplan sein.

[0116] Der Impfstoff kann in Verbindung mit anderen immunregulatorischen Agenzien verabreicht werden.

[0117] Als eine Alternative zu Impfstoffen auf Proteinbasis kann eine DNA-Impfung angewendet werden [z. B. Robinson & Torres (1997) Seminars in Immunology 9: 271-283, Donnelly et al. (1997) Annu Rev Immunol 15: 617-648, vgl. hier nachstehend].

Vehikel zur Verabreichung von Genen

[0118] Gentherapievehikel zur Verabreichung von Konstrukten, die eine erfindungsgemäße codierende Sequenz eines Therapeutikums umfassen, welche einem Säuger zur Expression im Säuger verabreicht werden sollen, können entweder lokal oder systemisch verabreicht werden. Diese Konstrukte können die viralen oder nicht-viralen Vektoransätze in einer in vivo- oder ex vivo-Modalität verwenden. Die Expression solcher codierender Sequenzen kann unter Verwendung von endogenen Säugerpromotoren oder heterologen Promotoren induziert werden. Die Expression der codierenden Sequenz in vivo kann entweder konstitutiv oder reguliert sein.

[0119] Die Erfindung umfasst Vehikel zur Verabreichung von Genen, die in der Lage sind, die in Erwägung gezogenen Nucleinsäuresequenzen zu exprimieren. Das Vehikel zur Verabreichung von Genen ist vorzugs-

weise ein viraler Vektor und stärker bevorzugt ein retroviraler, adenoviraler, Adeno-assoziiertes Virus-(AAV), herpesviraler oder Alphavirus-Vektor. Der virale Vektor kann auch ein viraler Astrovirus-, Coronavirus-, Orthomyxovirus-, Papovavirus-, Paramyxovirus-, Parvovirus-, Picornavirus-, Pockenvirus- oder Togavirus-Vektor sein. Vgl. im Allgemeinen Jolly (1994) *Cancer Gene Therapy* 1: 51-64, Kimura (1994) *Human Gene Therapy* 5: 845-852, Connolly (1995) *Human Gene Therapy* 6: 185-193 und Kaplitt (1994) *Nature Genetics* 6: 148-153.

[0120] Retrovirale Vektoren sind dem Fachmann wohlbekannt und wir ziehen in Erwägung, dass ein beliebiger retroviraler Gentherapievektor in der Erfindung anwendbar ist, einschließlich Retroviren vom B, C und D-Typ, xenotrope Retroviren (zum Beispiel NZB-X1, NZB-X2 und NZB9-1 (vgl. O'Neill (1985) *J. Virol.* 53: 160), polytrope Retroviren z. B. MCF und MCF-MLV (vgl. Kelly (1983) *J. Virol.* 45: 291), Spumaviren und Lentiviren. Vgl. RNA-Tumoviruses, Zweite Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985.

[0121] Teile des retroviralen Gentherapievektors können von verschiedenen Retroviren stammen. Zum Beispiel können Retrovektor-LTRs von einem Maus-Sarkomavirus, eine tRNA-Bindungsstelle aus einem Rous-Sarkomavirus, ein Verpackungssignal aus einem Maus-Leukämievirus und ein Ursprung einer Zweitstrangsynthese aus einem Vogel-Leukosevirus stammen.

[0122] Diese rekombinanten retroviralen Vektoren können verwendet werden, um transduktionskompetente retrovirale Vektorpartikel durch ihre Einführung in geeignete Verpackungszelllinien zu erzeugen (vgl. US-Patent 5,591,624). Retrovirusvektoren können zur ortsspezifischen Integration in Wirtszell-DNA durch Einbau eines chimären Integrase-Enzyms in den retroviralen Partikel konstruiert werden (vgl. WO96/37626). Es wird bevorzugt, dass der rekombinante virale Vektor ein replikationsdefektes rekombinantes Virus ist.

[0123] Verpackungszelllinien, die zur Verwendung mit den vorstehend beschriebenen Retrovirus-Vektoren geeignet sind, sind dem Fachmann wohlbekannt und sind einfach herzustellen (vgl. WO95/30763 und WO92/05266) und können verwendet werden, um Produktionszelllinien (auch Vektorzelllinien oder „VCLs“ genannt) für die Herstellung rekombinanter Vektorpartikel zu schaffen. Vorzugsweise werden die Verpackungszelllinien aus menschlichen Elternzellen (z. B. HT1080-Zellen) oder Nerz-Elternzelllinien erstellt, was die Inaktivierung in menschlichem Serum eliminiert.

[0124] Bevorzugte Retroviren zur Konstruktion von retroviralen Gentherapievektoren umfassen den Vogel-Leukosevirus, Rinder-Leukämievirus, Maus-Leukämievirus, Nerz-Zellen-Focus-induzierenden Virus, Maus-Sarkomvirus, Retikuloendotheliosevirus und Rous-Sarkomvirus. Besonders bevorzugte Maus-Leukämieviren umfassen 4070A und 1504A (Hartley und Rowe (1976) *J. Virol.* 19: 19-25), Abelson (ATCC-Nr. VR-999), Friend (ATCC-Nr. VR-245), Graffi, Gross (ATCC-Nr. VR-590), Kirsten, Harvey Sarkom-Virus und Rauscher (ATCC-Nr. VR-998) und Moloney-Maus-Leukämievirus (ATCC-Nr. VR-190). Solche Retroviren können aus Hinterlegungsstellen oder Sammlungen wie der American Type Culture Collection („ATCC“) in Rockville, Maryland erhalten oder aus bekannten Quellen unter Verwendung allgemein verfügbarer Verfahren isoliert werden.

[0125] Beispielhaft umfassen bekannte retrovirale Gentherapievektoren, die in dieser Erfindung verwendet werden können, jene, die in den Patentanmeldungen GB2200651, EP0415731, EP0345242, EP0334301, WO89/02468, WO89/05349, WO89/09271, WO90/02806, WO90/07936, WO94/03622, WO93/25698, WO93/25234, WO93/11230, WO93/10218, WO91/02805, WO91/02825, WO95/07994, US 5,219,740, US 4,405,712, US 4,861,719, US 4,980,289, US 4,777,127, US 5,591,624 offenbart werden. Vgl. auch Vile (1993) *Cancer Res.* 53: 3860-3864, Vile (1993) *Cancer Res.* 53: 962-967, Ram (1993) *Cancer Res.* 53 (1993) 83-88, Takamiya (1992) *J. Neurosci. Res.* 33: 493-503, Baba (1993) *J. Neurosurg.* 79: 729-735, Mann (1983) *Cell* 33: 153, Cane (1984) *Proc Natl Acad Sci* 81: 6349 und Miller (1990) *Human Gene Therapy* 1.

[0126] Menschliche adenovirale Gentherapievektoren sind dem Fachmann ebenfalls bekannt und in dieser Erfindung verwendbar. Vgl. zum Beispiel Berkner (1988) *Biotechniques* 6: 616 und Rosenfeld (1991) *Science* 252: 431 und WO93/07283, WO93/06223 und WO93/07282. Beispielhafte bekannte adenovirale Gentherapievektoren, die in dieser Erfindung angewendet werden können, umfassen jene, die in den vorstehend zitierten Dokumenten beschrieben werden, sowie in WO94/12649, WO93/03769, WO93/19191, WO94/28938, WO95/11984, WO95/00655, WO95/27071, WO95/29993, WO95/34671, WO96/05320, WO94/08026, WO94/11506, WO93/06223, WO94/24299, WO95/14102, WO95/24297, WO95/02697, WO94/28152, WO94/24299, WO95/09241, WO95/25807, WO95/05835, WO94/18922 und WO95/09654. Alternativ kann die Verabreichung von DNA, die an abgetötete Adenoviren geknüpft ist, wie in Curiel (1992) *Hum. Gene Ther.* 3: 147-154 beschrieben, angewendet werden. Die erfindungsgemäßen Vehikel zur Verabreichung von Genen umfassen auch Adenovirus-assoziiertes Virus (AAV)-Vektoren. Maßgebliche und bevorzugte Beispiele für sol-

che Vektoren zur Verwendung in dieser Erfindung sind die auf AAV-2 basierenden Vektoren, die in Srivastava, WO93/09239, offenbart werden. Die am stärksten bevorzugten AAV-Vektoren umfassen die beiden umgekehrten terminalen Wiederholungen von AAV, in welchen die nativen D-Sequenzen durch Substitution von Nucleotiden modifiziert sind, so dass mindestens 5 native Nucleotide bis zu 18 nativen Nucleotiden, vorzugsweise mindestens 10 native Nucleotide bis zu 18 nativen Nucleotiden und am stärksten bevorzugt 10 native Nucleotide erhalten bleiben und die verbleibenden Nucleotide der D-Sequenz deletiert oder durch nicht-native Nucleotiden ersetzt werden. Die nativen D-Sequenzen der umgekehrten terminalen Wiederholungen von AAV sind Sequenzen von 20 aufeinanderfolgenden Nucleotiden in jeder umgekehrten terminalen Wiederholung von AAV (d. h. es gibt eine Sequenz an jedem Ende), welche nicht an der Bildung von HP beteiligt sind. Das nicht-native Ersatznucleotid kann ein beliebiges anderes Nucleotid sein als das Nucleotid, welches in der nativen D-Sequenz an derselben Position gefunden wird. Andere anwendbare beispielhafte AAV-Vektoren sind pWP-19, pWN-1, welche beide in Nahreini (1993), Gene 124: 257-262, offenbart werden. Ein anderes Beispiel für einen solchen AAV-Vektor ist psub201 (vgl. Samulski (1987) J. Virol. 61: 3096). Ein anderer beispielhafter AAV-Vektor ist der Double-D-ITR-Vektor. Die Konstruktion des Double-D-ITR-Vektors wird im US-Patent 5,478,745 offenbart. Noch andere Vektoren sind solche, die in Carter, US-Patent 4,797,368 und Muzyczka, US-Patent 5,139,941, Chartejee, US-Patent 5,474,935 und Kotin, WO94/288157, offenbart werden. Noch ein anderes Beispiel für einen AAV-Vektor, der in dieser Erfindung anwendbar ist, ist SSV9AFABTKneo, welcher den AFP-Enhancer und den Albuminpromotor enthält und die Expression vorwiegend in der Leber steuert. Seine Struktur und Konstruktion werden in Su (1996) Human Gene Therapy 7: 463-470 offenbart. Zusätzliche AAV-Gentherapievektoren werden in US 5,354,678, US 5,173,414, US 5,139,941 und US 5,252,479 beschrieben.

[0127] Die erfindungsgemäßen Gentherapievektoren umfassen auch Herpesvektoren. Maßgebliche und bevorzugte Beispiele sind Herpes simplex-Virusvektoren, die eine Sequenz enthalten, welche ein Thymidinkinase-Polypeptid codiert, wie jene, die in US 5,288,641 und EP0176170 (Roizman) offenbart werden. Zusätzliche beispielhafte Herpes simplex-Virusvektoren umfassen HFEM/ICP6-LacZ, offenbart in WO95/04139 (Wistar Institute), pHSVlac, beschrieben in Geller (1988) Science 241: 1667-1669 und in WO90/09441 und WO92/07945, HSV Us3::pgC-LacZ, beschrieben in Fink (1992) Human Gene Therapy 3:11-19, und HSV 7134, 2 RH 105 und GAL4, beschrieben in EP 0453242 (Breakefield), und jene, die bei der ATCC mit der Zugangsnummer ATCC VR-977 und ATCC VR-260 hinterlegt wurden.

[0128] Ebenfalls in Erwägung gezogen werden Alphavirus-Gentherapievektoren, welche in dieser Erfindung verwendet werden können. Bevorzugte Alphavirus-Vektoren sind Sindbisvirus-Vektoren, Togaviren, Semliki-Forestvirus (ATCC VR-67, ATCC VR-1247), Middlebergvirus (ATCC VR-370), Ross-River-Virus (ATCC VR-373, ATCC VR-1246), venezuelanischer Pferde-Enzephalitisvirus (ATCC VR923, ATCC VR-1250, ATCC VR-1249, ATCC VR-532) und jene, die in den US-Patenten 5,091,309 und 5,217,879 und WO92/10578 beschrieben werden. Genauer gesagt, sind jene Alphavirusvektoren, die in US-Serien-Nr. 08/405,627, eingereicht am 15. März 1995, WO94/21792, WO92/10578, WO95/07994, US 5,091,309 und US 5,217,879 beschrieben werden, anwendbar. Solche Alphaviren können von Hinterlegungsstellen oder Sammlungen wie der ATCC in Rockville, Maryland, erhalten werden oder aus bekannten Quellen unter Verwendung allgemein verfügbarer Verfahren isoliert werden. Vorzugsweise werden Alphaviren mit verringerter Cytotoxizität verwendet (vgl. USSN 08/679640).

[0129] DNA-Vektorsysteme wie eukaryontische geschichtete Expressionssysteme sind ebenfalls zur Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuren nützlich. Vgl. WO95/07994 für eine genaue Beschreibung der eukaryontischen geschichteten Expressionssysteme. Vorzugsweise stammen die eukaryontischen geschichteten Expressionssysteme der Erfindung von Alphavirusvektoren und am stärksten bevorzugt von viralem Sindbisvirus-Vektoren.

[0130] Andere virale Vektoren, die zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, umfassen solche, die vom Poliovirus stammen, zum Beispiel ATCC VR-58, und solche, die beschrieben werden in Evans, Nature 339 (1989) 385, und Sabin (1973) J. Biol. Standardization 1: 115, Rhinovirus, zum Beispiel ATCC VR-1110, und solche, die beschrieben werden in Arnold (1990) J Cell Biochem. L401, Pockenviren wie den Kanarien-Pockenvirus oder Vacciniavirus, zum Beispiel ATCC VR-111 und ATCC VR-2010, und solche, die beschrieben werden in Fisher-Hoch (1989) Proc Natl Acad Sci 86: 317, Flexner (1989) Ann NY Acad Sci 569: 86, Flexner (1990) Vaccine 8: 17, in US 4,603,112 und US 4,769,330 und WO89/01973, SV40-Virus, zum Beispiel ATCC VR-305 und solche, die beschrieben werden in Mulligan (1979) Nature 277: 108 und Madzak (1992) J Gen Virol 73: 1533, Influenzavirus, zum Beispiel ATCC VR-797 und rekombinante Influenzaviren, hergestellt unter Verwendung von umgekehrten genetischen Verfahren, wie sie beschrieben werden in US 5,166,057 und in Enami (1990) Proc Natl Acad Sci 87: 3802-3805, Enami & Palese (1991) J Virol 65: 2711-2713 und Luytjes

(1989) Cell 59: 110 (vgl. auch McMichael (1983) NEJ Med 309: 13 und Yap (1978) Nature 273: 238 und Nature (1979) 277: 108), menschlichen Immunschwächevirus, wie beschrieben in EP-0386882 und in Buchschacher (1992) J. Virol. 66: 2731, Masernvirus, zum Beispiel ATCC VR-67 und VR-1247 und solche, die beschrieben werden in EP-0440219, Auravirus, zum Beispiel ATCC VR-368, Bebaruivirus, zum Beispiel ATCC VR-600 und ATCC VR-1240, Cabassovirus, zum Beispiel ATCC VR-922, Chikungunyavirus, zum Beispiel ATCC VR-64 und ATCC VR-1241, Fort-Morgan-Virus, zum Beispiel ATCC VR-924, Getahvirus, zum Beispiel ATCC VR-369 und ATCC VR-1243, Kyzylagachvirus, zum Beispiel ATCC VR-927, Mayaravirus, zum Beispiel ATCC VR-66, Mucambovirus, zum Beispiel ATCC VR-580 und ATCC VR-1244, Ndumuvirus, zum Beispiel ATCC VR-371, Pixunavirus, zum Beispiel ATCC VR-372 und ATCC VR-1245, Tonatevirus, zum Beispiel ATCC VR-925, Trinitivir, zum Beispiel ATCC VR-469, Unavirus, zum Beispiel ATCC VR-374, Whataroavirus, zum Beispiel ATCC VR-926, Y-62-33-Virus, zum Beispiel ATCC VR-375, O'Nyongvirus, Esstern-Encephalitis-Virus, zum Beispiel ATCC VR-65 und ATCC VR-1242, Western-Encephalitis-Virus, zum Beispiel ATCC VR-70, ATCC VR-1251, ATCC VR-622 und ATCC VR-1252 und Koronavirus, zum Beispiel ATCC VR-740 und solche, die in Hamre (1966) Proc Soc Exp Biol Med 121: 190, beschrieben werden.

[0131] Die Verabreichung der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen in Zellen ist nicht auf die vorstehend erwähnten viralen Vektoren beschränkt. Andere Verabreichungsverfahren und Medien können angewendet werden, wie zum Beispiel Nucleinsäureexpressionsvektoren, polykationische kondensierte DNA, verknüpft oder nicht verknüpft mit abgetöteten Adenoviren alleine, vgl. zum Beispiel US-Serien-Nr. 08/366,787, eingereicht am 30. Dezember 1994 und Curiel (1992) Hum Gene Ther 3: 147-154, Liganden-verknüpfte DNA, vgl. zum Beispiel Wu (1989) J Biol Chem 264: 16985-16987, Vehikelzellen zur Verabreichung in eukaryontische Zellen, vgl. zum Beispiel US-Serien-Nr. 08/240,030, eingereicht am 9. Mai 1994, und US-Serien-Nr. 08/404,796, Ablagerung von photopolymerisierten Hydrogel-Materialien, handgehaltene Gentransfer-Partikelpistole, wie im US-Patent 5,149,655 beschrieben, Ionisierungsbestrahlung, wie in US 5,206,152 und in WO92/11033 beschrieben, Nuclein-Ladungsneutralisierung oder Fusion mit Zellmembranen. Zusätzliche Ansätze werden in Philip (1994) Mol Cell Biol 14: 2411-2418 und in Woffendin (1994) Proc Natl Acad Sci 91: 1581-1585 beschrieben.

[0132] Partikel-vermittelter Gentransfer kann angewendet werden, vgl. zum Beispiel US-Serien-Nr. 60/023,867. In Kürze, die Sequenz kann in konventionelle Vektoren eingefügt werden, welche konventionelle Kontrollsequenzen für Expression auf hohem Niveau enthalten, und dann mit synthetischen Gentransfermolekülen wie polymeren DNA-bindende Kationen wie Polylysin, Protamin und Albumin inkubiert werden, welche an zellansteuernde Liganden wie Asialoorosomucoid, wie in Wu & Wu (1987) J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 beschrieben, an Insulin, wie in Hucked (1990) Biochem. Pharmacol. 40: 253-263 beschrieben, an Galactose, wie in Plank (1992) Bioconjugate Chem 3: 533-539 beschrieben, an Lactose oder Transferrin geknüpft sind.

[0133] Nackte DNA kann ebenfalls angewendet werden. Beispielhafte Verfahren zur Einführung nackter DNA werden in WO90/11092 und US 5,580,859 beschrieben. Die Aufnahmeeffizienz kann unter Verwendung von biodegradierbaren Latexkügelchen verbessert werden. Mit DNA beschichtete Latexkügelchen werden nach Initiation von Endocytose durch die Kügelchen effizient in Zellen transportiert. Das Verfahren kann durch Behandlung der Kügelchen weiter verbessert werden, so dass die Hydrophobie erhöht und dadurch das Aufbrechen des Endosoms und die Freisetzung der DNA ins Cytoplasma erleichtert wird.

[0134] Liposomen, die als Vehikel zur Verabreichung von Genen fungieren können, sind in US 5,422,120, WO95/13796, WO94/23697, WO91/14445 und EP-524,968 beschrieben. Wie in USSN. 60/023,867 beschrieben, können Nucleinsäuresequenzen, die ein Polypeptid codieren, bei nicht-viraler Verabreichung in konventionelle Vektoren eingefügt werden, welche konventionelle Kontrollsequenzen zur Expression auf hohem Niveau enthalten, und dann mit synthetischen Gentransfermolekülen wie polymeren DNA-bindenden Kationen wie Polylysin, Protamin und Albumin inkubiert werden, welche an zellansteuernde Liganden wie Asialoorosomucoid, Insulin, Galactose, Lactose oder Transferrin geknüpft sind. Andere Verabreichungssysteme umfassen die Verwendung von Liposomen, um DNA mit dem Gen unter Kontrolle einer Vielzahl gewebespezifischer oder universell aktiver Promotoren einzukapseln. Weiterhin umfassen nicht-virale Verabreichungen, die zur Verwendung geeignet sind, mechanische Verabreichungssysteme wie der Ansatz, der in Woffendin et al (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(24): 11581-11585, beschrieben wird. Außerdem können die codierende Sequenz und das Expressionsprodukt davon durch Ablagerung eines photopolymerisierten Hydrogelmaterials verabreicht werden. Andere konventionelle Verfahren zur Verabreichung von Genen, welche zur Verabreichung der codierenden Sequenz verwendet werden können, umfassen zum Beispiel die Verwendung von handgehaltenen Gentransfer-Partikelpistolen, wie in US 5,149,655 beschrieben; die Verwendung von ionisierender Strahlung zur Aktivierung übertragener Gene, wie in US 5,206,152 und WO92/11033 beschrieben.

[0135] Beispielhafte liposomale und polykationische Vehikel zur Verabreichung von Genen sind solche, die beschrieben werden in US 5,422,120 und 4,762,915, in WO95/13796, WO94/23697 und WO91/14445, in EP-0524968 und in Stryer, Biochemistry, Seiten 236-240 (1975) W.H. Freeman, San Francisco, Szoka (1980) Biochim Biophys Acta 600: 1, Bayer (1979) Biochim Biophys Acta 550: 464, Rivnay (1987) Meth Enzymol 149: 119, Wang (1987) Proc Natl Acad Sci 84: 7851, Plant (1989) Anal Biochem 176: 420.

[0136] Eine Polynucleotidzusammensetzung kann therapeutisch wirksame Mengen eines Vehikels zur Gen-therapie umfassen, wie der Begriff vorstehend definiert wird. Zu erfindungsgemäßen Zwecken liegt die wirksame Dosis bei etwa 0,01 mg/kg bis 50 mg/kg oder 0,05 mg/kg bis etwa 10 mg/kg der DNA-Konstrukte im Individuum, an das es verabreicht wird.

Verabreichungsverfahren

[0137] Einmal formuliert, können die erfindungsgemäßen Polynucleotidzusammensetzungen (1) dem Individuum direkt verabreicht werden, (2) ex vivo an Zellen aus dem Individuum oder (3) in vitro zur Expression rekombinanter Proteine verabreicht werden. Die zu behandelnden Individuen können Säuger oder Vögel sein. Es können auch menschliche Individuen behandelt werden.

[0138] Die direkte Verabreichung der Zusammensetzungen kann allgemein durch Injektion, entweder subcutan, intraperitoneal, intravenös oder intramuskulär ausgeführt werden oder in den Interstitialraum eines Gewebes verabreicht werden. Die Zusammensetzungen können auch in eine Läsion verabreicht werden. Andere Verabreichungsformen umfassen orale und pulmonale Verabreichung, Zäpfchen und transdermale oder transcutane Anwendungen (vgl. z. B. WO98/20734), Nadeln und Genspistolen oder Hyposprays. Das Behandlungsdosisschema kann ein Einzeldosis- oder Mehrfachdosisschema sein.

[0139] Verfahren für die ex vivo-Verabreichung und Reimplantation transformierter Zellen in ein Individuum sind dem Fachmann bekannt und werden z. B. in WO93/14778 beschrieben. Beispiele für Zellen, die in ex vivo-Anwendungen nützlich sind, umfassen zum Beispiel Stammzellen, insbesondere hämatopoetische, Lymphzellen, Makrophagen, dendritische Zellen oder Tumorzellen.

[0140] Im Allgemeinen kann die Verabreichung von Nucleinsäuren sowohl für ex vivo- als auch in vitro-Anwendungen durch die folgenden Verfahren erreicht werden, zum Beispiel Dextran-vermittelte Transfektion, Calciumphosphat-Präzipitation, Polybrenvermittelte Transfektion, Protoplastenfusion, Elektroporation, Verkapselung des/r Polynucleotids/e in Liposomen und direkte Mikroinjektion der DNA in Kerne, die alle dem Fachmann wohlbekannt sind.

Polynucleotid- und Polypeptid-Arzneimittel

[0141] Zusätzlich zu den vorstehend beschriebenen pharmazeutisch verträglichen Trägern und Salzen können die folgenden zusätzlichen Agenzien bei Polynucleotid- und/oder Polypeptid-Zusammensetzungen verwendet werden.

A. Polypeptide

[0142] Ein Beispiel sind Polypeptide, welche ohne Einschränkung umfassen: Asioloosomucosid (ASOR), Transferrin, Asialoglycoproteine, Antikörper, Antikörperfragmente, Ferritin, Interleukine, Interferone, Granulocyten, Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF), Granulocyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF), Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF), Stammzellfaktor und Erythropoetin. Virale Antigene wie Hüllproteine können ebenfalls verwendet werden. Ebenso Proteine aus anderen invasiven Organismen wie das 17 Aminosäuren-Peptid aus dem Circumsporozoitprotein aus Plasmodium falciparum, bekannt als RII.

B. Hormone, Vitamine etc.

[0143] Andere Gruppen, die eingeschlossen werden können, sind zum Beispiel: Hormone, Steroide, Androgene, Östrogene, Thyroidhormone oder Vitamine, Folsäure.

C. Polyalkylene, Polysaccharide etc.

[0144] Auch Polyalkylenglycol kann den gewünschten Polynucleotiden/Polypeptiden hinzugefügt werden. In

einer bevorzugten Ausführungsform ist das Polyalkylenglycol Polyethylenglycol. Zusätzlich können Mono-, Di- oder Polysaccharide hinzugefügt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform in dieser Hinsicht ist das Polysaccharid Dextran oder DEAE-Dextran. Ebenso Chitosan und Poly(lactid-co-glycolid).

D. Lipide und Liposomen

[0145] Das gewünschte Polynucleotid/Polypeptid kann auch vor der Verabreichung an das Individuum oder an Zellen daraus in Lipide eingekapselt oder in Liposomen verpackt werden.

[0146] Das Einkapseln in Lipide wird allgemein unter Verwendung von Liposomen erreicht, welche in der Lage sind, Nucleinsäure stabil zu binden oder einzufangen und zurückzuhalten. Das Verhältnis kondensierter Polynucleotide zur Herstellung von Lipiden kann variieren, wird aber im Allgemeinen bei etwa 1: 1 liegen (mg DNA:Mikromol Lipid) oder mehr vom Lipid. Für eine Übersicht über die Verwendung von Liposomen als Träger für die Verabreichung von Nucleinsäuren vgl. Hug und Sleight (1991) *Biochim. Biophys. Acta*. 1097: 1-17, Straubinger (1983) *Meth. Enzymol.* 101: 512-527.

[0147] Liposomale Zubereitungen zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung umfassen kationische (positiv geladene), anionische (negativ geladene) und neutrale Zubereitungen. Für kationische Liposomen wurde gezeigt, dass sie eine intrazelluläre Verabreichung von Plasmid-DNA (Felgner (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-7416), mRNA (Malone (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6077-6081) und gereinigter Transkriptionsfaktoren (Debs (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 10189-10192, in funktioneller Form vermitteln.

[0148] Kationische Liposomen sind leicht verfügbar. Zum Beispiel sind N[1-2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triethylammonium (DOTMA)-Liposomen unter dem Markennamen Lipofectin von GIBCO BRL, Grand Island, NY, verfügbar. (Vgl. auch Felgner, vorstehend). Andere kommerziell erhältliche Liposomen umfassen Transfectace (DDAB/DOPE) und DOTAP/DOPE (Boehringer). Andere kationische Liposomen können aus leicht verfügbaren Materialien unter Verwendung von Verfahren, die dem Fachmann wohlbekannt sind, hergestellt werden. Vgl. auch Szoka (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4194-4198, WO90/11092 für eine Beschreibung der Synthese von DOTAP (1,2-bis(oleoyloxy)-3-(trimethylammonio)propan)-Liposomen.

[0149] In ähnlicher Weise sind anionische und neutrale Liposomen leicht verfügbar, wie die von Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL), oder sie können einfach unter Verwendung leicht verfügbarer Materialien hergestellt werden. Solche Materialien umfassen unter anderem Phosphatidylcholin, Cholesterin, Phosphatidylethanolamin, Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC), Dioleoylphosphatidylglycerin (DOPG), Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE). Diese Materialien können auch mit den DOTMA- und DOTAP-Startmaterialien in geeigneten Verhältnissen gemischt werden.

[0150] Verfahren zur Herstellung von Liposomen unter Verwendung dieser Materialien sind dem Fachmann wohlbekannt.

[0151] Die Liposomen können multilamellare Vesikel (MLVs), kleine unilamellare Vesikel (SUVs) oder große unilamellare Vesikel (LUVs) umfassen. Die verschiedenen Liposomen-Nucleinsäure-Komplexe werden unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren hergestellt. Vgl. z. B. Straubinger (1983) *Meth. Immunol.* 101: 512-527, Szoka (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4194-4198, Papahadjopoulos (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 394: 483, Wilson (1979) *Cell* 17: 77, Deamer & Bangham (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 443: 629, Ostro (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76: 836, Fraley (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3348, Enoch & Strittmatter (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 145, Fraley (1980) *J. Biol. Chem.* (1980) 255: 10431, Szoka & Papahadjopoulos (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 145 und Schaefer-Ridder (1982) *Science* 215: 166.

E. Lipoproteine

[0152] Zusätzlich können Lipoproteine dem zu verabreichenden Polynucleotid/Polypeptid hinzugefügt werden. Beispiele für zu verwendende Lipoproteine umfassen:

Chylomikronen, HDL, IDL, LDL und VLDL. Mutanten, Fragmente oder Fusionen dieser Proteine können auch verwendet werden. Es können auch Modifikationen von natürlich vorkommenden Lipoproteinen wie acetyliertes LDL verwendet werden. Diese Lipoproteine können Polynucleotide zielgerichtet an Zellen verabreichen, welche Lipoproteinrezeptoren exprimieren. Vorzugsweise ist kein anderer zielführender Ligand in der Zusammensetzung enthalten, wenn Lipoproteine bei dem zu verabreichenden Polynucleotid enthalten sind.

[0153] Natürlich vorkommende Lipoproteine umfassen ein Lipid und einen Proteinanteil. Die Proteinanteile sind als Apoproteine bekannt. Derzeit wurden Apoproteine A, B, C, D und E isoliert und identifiziert. Mindestens zwei von diesen enthalten mehrere Proteine, die mit den römischen Ziffern AI, AII, AIV, CI, CII und CIII bezeichnet werden.

[0154] Ein Lipoprotein kann mehr als ein Apoprotein umfassen. Zum Beispiel umfassen natürlich vorkommende Chylomikronen A, B, C und E; mit der Zeit verlieren diese Lipoproteine A und erwerben die Apoproteine C und E. VLDL umfasst die Apoproteine A, B, C und E, LDL umfasst Apoprotein B und HDL umfasst die Apoproteine A, C und E.

[0155] Die Aminosäuren dieser Apoproteine sind bekannt und werden zum Beispiel in Breslow (1985) *Annu Rev. Biochem* 54: 699, Law (1986) *Adv. Exp. Med. Biol.* 151: 162, Chen (1986) *J. Biol. Chem.* 261: 12918, Kane (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2465 und Uterman (1984) *Hum Genet* 65: 232, beschrieben.

[0156] Lipoproteine enthalten eine Vielzahl von Lipiden einschließlich Triglyceride, Cholesterin (frei und Ester) und Phospholipide. Die Zusammensetzung der Lipide variiert in natürlich vorkommenden Lipoproteinen. Zum Beispiel umfassen Chylomikronen hauptsächlich Triglyceride. Eine genauere Beschreibung des Lipidgehalts von natürlich vorkommenden Lipoproteinen kann zum Beispiel in *Meth. Enzymol.* 128 (1986) gefunden werden. Die Zusammensetzung der Lipide wird so ausgewählt, dass sie die Konformation des Apoproteins hinsichtlich der Rezeptorbindungsaktivität unterstützt. Die Zusammensetzung von Lipiden kann auch dazu ausgewählt werden, die hydrophobe Wechselwirkung und Assoziation mit dem Polynucleotid-bindenden Molekül zu erleichtern.

[0157] Natürlich vorkommende Lipoproteine können zum Beispiel durch Ultrazentrifugation aus dem Serum isoliert werden. Solche Verfahren werden in *Meth. Enzymol.* (vorstehend), Pitas (1980) *J. Biochem.* 255: 5454-5460 und Mahey (1979) *J. Clin. Invest* 64: 743-750, beschrieben. Lipoproteine können auch durch in vitro- oder rekombinante Verfahren durch Expression der Apoprotein-Gene in einer gewünschten Wirtszelle hergestellt werden. Vgl. zum Beispiel Atkinson (1986) *Annu Rev Biophys Chem* 15: 403 und Radding (1958) *Biochim Biophys Acta* 30: 443. Lipoproteine können auch von kommerziellen Zulieferern wie Biomedical Technologies, Inc., Stoughton, Massachusetts, bezogen werden. Eine weitere Beschreibung von Lipoproteinen kann bei Zuckermann et al. WO98/06437 gefunden werden.

F. Polykationische Agenzien

[0158] Polykationische Agenzien können mit oder ohne Lipoprotein in einer Zusammensetzung mit dem gewünschten, zu verabreichenden Polynucleotid/Polypeptid eingeschlossen werden.

[0159] Polykationische Agenzien zeigen bei einem physiologisch relevanten pH-Wert typischerweise eine positive Nettoladung und sind in der Lage, die elektrische Ladung von Nucleinsäuren zu neutralisieren, um die Verabreichung an einen gewünschten Ort zu erleichtern. Diese Agenzien haben sowohl in vitro als auch ex vivo- und in vivo-Anwendungen. Polykationische Agenzien können verwendet werden, um Nucleinsäuren einem lebenden Individuum entweder intramuskulär, subcutan etc. zu verabreichen.

[0160] Die Folgenden sind Beispiele für nützliche Polypeptide als polykationische Agenzien: Polylysin, Polyarginin, Polyornithin und Protamin. Andere Beispiele umfassen Histone, Protamine, menschliches Serumalbumin, DNA-bindende Proteine, chromosomale nicht-Histon-Proteine, Hüllproteine von DNA-Viren wie X174; Transkriptionsfaktoren enthalten auch Domänen, welche DNA binden, und daher als Nucleinsäure-kondensierende Agenzien nützlich sein können. In Kürze gesagt, Transkriptionsfaktoren wie C/CEBP, c-jun, c-fos, AP-1, AP-2, AP-3, CPF, Prot-1, Sp-1, Oct-1, Oct-2, CREP und TFIID enthalten basische Domänen, welche DNA-Sequenzen binden.

[0161] Organische polykationische Agenzien umfassen: Spermin, Spermidin und Putrescin.

[0162] Die Dimensionen und die physikalischen Eigenschaften von polykationischen Agenzien können aus der vorstehenden Liste extrapoliert werden, um andere polykationische Polypeptid-Agenzien zu konstruieren oder um synthetische polykationische Agenzien herzustellen.

[0163] Synthetische polykationische Agenzien, welche nützlich sind, umfassen zum Beispiel DEAE-Dextran und Polybren. Lipofectin™ und LipofectAMINE™ sind Monomere, welche polykationische Komplexe bilden, wenn sie mit Polynucleotiden/Polypeptiden kombiniert werden.

Immundiagnostische Tests

[0164] Erfindungsgemäße Neisseria-Antigene können in Immuntests verwendet werden, um Antikörperspiegel nachzuweisen (oder umgekehrt können anti-Neisseria-Antikörper verwendet werden, um Antigenspiegel nachzuweisen). Immuntests, basierend auf wohldefinierten rekombinanten Antigenen, können entwickelt werden, um invasive diagnostische Verfahren zu ersetzen. Antikörper gegen Neisseria-Proteine in biologischen Proben, einschließlich zum Beispiel Blut- oder Serumproben, können nachgewiesen werden. Die Gestaltung der Immuntests unterliegt einer großen Variation und eine Vielzahl davon ist dem Fachmann bekannt. Protokolle für den Immuntest können zum Beispiel auf Konkurrenz oder einer direkten Reaktion oder auf Tests von Sandwich-Typ basieren. Die Protokolle können zum Beispiel auch feste Träger verwenden oder sie können auf Immunpräzipitation beruhen. Die meisten Tests beziehen die Verwendung von markierten Antikörpern oder Polypeptiden ein; die Markierungen können zum Beispiel fluoreszierende, chemolumineszierende, radioaktive oder Farbstoff-Moleküle sein. Tests, welche die Signale von der Sonde amplifizieren, sind ebenfalls bekannt; Beispiele dafür sind Tests, welche Biotin und Avidin verwenden, und Enzym-markierte und -vermittelte Immuntests sowie ELISA-Tests.

[0165] Kits, die für die Immundiagnose geeignet sind und die geeigneten Markierungsreagenzien enthalten, werden durch Verpacken der geeigneten Materialien, einschließlich der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen, in geeigneten Behältern zusammen mit verbleibenden Reagenzien und Materialien (zum Beispiel geeignete Puffer, Salzlösungen etc.), die zur Durchführung des Tests benötigt werden, sowie eines geeigneten Satzes von Testanleitungen, erstellt.

Nucleinsäure-Hybridisierung

[0166] „Hybridisierung“ bezieht sich auf die Assoziierung von zwei Nucleinsäuresequenzen aneinander durch Wasserstoff-Bindung. Typischerweise wird eine Sequenz auf einen festen Träger fixiert und die andere ist frei in Lösung. Dann werden die beiden Sequenzen unter Bedingungen, die Wasserstoffbindungen fördern, in Kontakt miteinander gebracht. Faktoren, die diese Bindung beeinflussen, umfassen: den Typ und das Volumen des Lösungsmittels, die Reaktionstemperatur, die Hybridisierungszeit, Bewegung, Agenzien, welche die unspezifische Anheftung der Sequenz in der flüssigen Phase an den festen Träger blockieren (Denhardts-Reagens oder BLOTTO), die Konzentration der Sequenzen, die Verwendung von Verbindungen zur Erhöhung der Geschwindigkeit der Assoziierung von Sequenzen (Dextransulfat oder Polyethylenglycol) und die Stringenz der Waschbedingungen nach der Hybridisierung. Vgl. Sambrook et al. [vorstehend] Band 2, Kapitel 9, Seiten 9.47 bis 9.57.

[0167] „Stringenz“ bezieht sich auf Bedingungen in einer Hybridisierungsreaktion, welche die Assoziierung von sehr ähnlichen Sequenzen gegenüber Sequenzen, die sich unterscheiden, fördern. Zum Beispiel sollte die Kombination aus Temperatur und Salzkonzentration gewählt werden, die etwa 120 bis 200°C unter der berechneten T_m des untersuchten Hybrids ist. Die Temperatur- und Salzbedingungen können oft in vorläufigen Untersuchungen empirisch bestimmt werden, in welchen Proben von auf Filtern immobilisierter genomischer DNA an interessierende Sequenzen hybridisiert und dann unter Bedingungen unterschiedlicher Stringenz gewaschen werden. Vgl. Sambrook et al. auf Seite 9.50.

[0168] Variable, die bei der Durchführung von zum Beispiel eines Southern-Blot-Verfahrens zu bedenken sind, sind (1) die Komplexität der zu blottenden DNA und (2) die Homologie zwischen der Sonde und den nachzuweisenden Sequenzen. Die Gesamtmenge der zu untersuchenden Fragmente kann in einer Größenordnung von 10 variieren, von 0,1 bis 1 µg für einen Plasmid- oder Phagenverdau, 10^{-9} bis 10^{-8} g für ein Gen in einer einzigen Kopie in einem hochkomplexen eukaryontischen Genom. Für Polynucleotide geringerer Komplexität kann eine wesentlich kürzere Zeit zum Blotten, zur Hybridisierung und für die Expositionszeit, eine kleinere Menge der Start-Polynucleotide und eine geringere spezifische Aktivität der Sonden verwendet werden. Zum Beispiel kann eine Hefegen in einer einzigen Kopie mit einer Expositionszeit von nur einer Stunde, beginnend mit 1 µg Hefe-DNA, Blotten für zwei Stunden und Hybridisierung für 4-8 Stunden mit einer Sonde von 10^8 ZpM („cpm“ für Zählimpulse pro Minute)/µg nachgewiesen werden. Für ein Säugergen in einer einzigen Kopie würde ein konservativer Ansatz mit 10 µg DNA, Blotten über Nacht und Hybridisierung über Nacht in Gegenwart von 10% Dextransulfat unter Verwendung einer Sonde von mehr als 10^8 ZpM/µg beginnen, was zu einer Expositionszeit von ~24 Stunden führt.

[0169] Einige Faktoren können die Schmelztemperatur (T_m) eines DNA-DNA-Hybrids zwischen der Sonde und dem interessierenden Fragment und infolgedessen die geeigneten Bedingungen zur Hybridisierung und für das Waschen beeinflussen. In vielen Fällen ist die Sonde nicht zu 100% zu dem Fragment homolog. Andere

Variable, die häufig vorkommen, umfassen die Länge und den Gesamtgehalt von G + C der hybridisierenden Sequenzen und die Ionenstärke und den Formamidgehalt des Hybridisierungspuffers. Die Wirkungen all dieser Faktoren können annähernd durch eine einzelne Gleichung dargestellt werden:

$$T_m = 81 + 16,6(\log_{10} C_i) + 0,4[\%(G + C) - 0,6(\% \text{ Formamid}) - 600/n - 1,5 (\% \text{ Fehlpaarungen})],$$

wobei C_i die Salzkonzentration (monovalente Ionen) ist und n die Länge des Hybrids in Basenpaaren (leicht modifiziert nach Meinkoth & Wahl (1984) Anal. Biochem. 138: 267-284).

[0170] Bei der Planung eines Hybridisierungsexperiments können einige Faktoren, welche die Nucleinsäure-Hybridisierung beeinflussen, einfach geändert werden. Die Temperatur für die Hybridisierung und das Waschen und die Salzkonzentration während des Waschens sind am einfachsten anzupassen. Wenn die Hybridisierungstemperatur steigt (d. h. die Stringenz), wird es weniger wahrscheinlich für die Hybridisierung, dass sie zwischen Strängen stattfindet, die nicht homolog sind, und dadurch verringert sich der Hintergrund. Wenn die radioaktiv markierte Sonde nicht vollständig homolog mit dem immobilisierten Fragment ist (wie es häufig bei Genfamilien- und Interspezies-Hybridisierungsexperimenten der Fall ist), muss die Hybridisierungstemperatur gesenkt werden und der Hintergrund erhöht sich. Die Waschtemperatur beeinflusst die Intensität der hybridisierenden Bande und die Höhe des Hintergrunds in einer ähnlichen Weise. Die Stringenz des Waschens wird auch mit sinkenden Salzkonzentrationen erhöht.

[0171] Im Allgemeinen sind günstige Hybridisierungstemperaturen in Gegenwart von 50% Formamid 42°C für eine Sonde, welche 95% bis 100% homolog zum Zielfragment ist, 37°C für 90% bis 95% Homologie und 32°C für 85% bis 90% Homologie. Für geringere Homologien sollte unter Anwendung der vorstehenden Gleichung der Formamidgehalt gesenkt und die Temperatur entsprechend angepasst werden. Wenn die Homologie zwischen der Sonde und dem Zielfragment nicht bekannt ist, ist der einfachste Ansatz, mit Hybridisierungs- und Waschbedingungen zu beginnen, die nicht stringent sind. Wenn nach der Autoradiographie unspezifische Banden oder ein hoher Hintergrund beobachtet werden, kann der Filter bei hoher Stringenz gewaschen und erneut exponiert werden. Wenn die zur Exposition benötigte Zeit diesen Ansatz nicht praktikabel macht, sollten mehrere Hybridisierungs- und/oder Waschstringenzen parallel getestet werden.

Nucleinsäuresondentests

[0172] Mit Verfahren wie PCR, Sondentests mit verzweigter DNA oder Blotverfahren unter Verwendung von erfindungsgemäßen Nucleinsäuresonden kann die Anwesenheit von cDNA oder mRNA bestimmt werden. Von einer Sonde wird gesagt, dass sie mit einer erfindungsgemäßen Sequenz „hybridisiert“, wenn sie ein Duplexmolekül oder einen doppelsträngigen Komplex bilden kann, das/der stabil genug ist, um nachgewiesen zu werden.

[0173] Die Nucleinsäuresonden hybridisieren an die erfindungsgemäßen Neisseria-Nucleotidsequenzen (einschließlich Sense- und Antisense-Stränge). Obwohl viele verschiedene Nucleotidsequenzen die Aminosäuresequenz codieren, wird die native Neisseria-Sequenz bevorzugt, da sie die tatsächlich in den Zellen vorhandene Sequenz ist. Die mRNA repräsentiert eine codierende Sequenz und daher sollte eine Sonde komplementär zur codierenden Sequenz sein; einzelsträngige cDNA ist komplementär zur mRNA und daher sollte eine cDNA-Sonde komplementär zur nicht-codierenden Sequenz sein.

[0174] Die Sondensequenz muss nicht identisch mit der Neisseria-Sequenz (oder ihrem komplementären Gegenstück) sein – einige Variationen in der Sequenz und in der Länge können zu einer erhöhten Sensitivität des Tests führen, wenn die Nucleinsäuresonde ein Duplexmolekül mit den Zielnucleotiden bilden kann, das nachgewiesen werden kann. Die Nucleinsäuresonde kann auch zusätzliche Nucleotide umfassen, um das gebildete Duplexmolekül zu stabilisieren. Zusätzliche Neisseria-Sequenzen können auch als Markierung zum Nachweis des gebildeten Duplexmoleküls hilfreich sein. Zum Beispiel kann eine nicht-komplementäre Nucleotidsequenz an das 5'-Ende der Sonde geknüpft werden, wobei der Rest der Sondensequenz komplementär zur Neisseria-Sequenz ist. Alternativ können nicht-komplementäre Basen oder längere Sequenzen in die Sonde eingestreut sein, vorausgesetzt, dass die Sondensequenz ausreichend Komplementarität mit der Neisseria-Sequenz hat, um damit zu hybridisieren und dadurch ein Duplexmolekül zu bilden, das nachgewiesen werden kann.

[0175] Die genaue Länge und Sequenz der Sonde hängt von den Hybridisierungsbedingungen wie Temperatur, Salzbedingungen und Ähnlichem ab. Zum Beispiel enthält die Nucleinsäuresonde für diagnostische Anwendungen abhängig von der Komplexität der Analytensequenz typischerweise mindestens 10-20 Nucleoti-

de, vorzugsweise 15-25 und stärker bevorzugt mindestens 30 Nucleotide, obwohl sie kürzer sein kann. Kurze Primer benötigen im Allgemeinen kältere Temperaturen, um ausreichend stabile Hybridkomplexe mit der Matrize zu bilden.

[0176] Sonden können mit synthetischen Verfahren wie dem Triesterverfahren von Matteucci et al. [J. Am. Chem. Soc. (1981) 103: 3185] oder gemäß Urdea et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80: 7461] oder unter Verwendung eines im Handel erhältlichen automatisierten Oligonucleotid-Synthesegeräts hergestellt werden.

[0177] Die chemische Natur der Sonde kann je nach Präferenz ausgewählt werden. Für bestimmte Anwendungen sind DNA oder RNA geeignet. Für andere Anwendungen können Modifizierungen eingebaut werden, z. B. Rückgrat-Modifizierungen wie Phosphorthioate oder Methylphosphonate können verwendet werden, um die Halbwertszeit in vivo zu erhöhen, die RNA-Affinität zu ändern, die Resistenz gegenüber Nucleasen zu erhöhen etc. [vgl. z. B. Agrawal & Iyer (1995) Curr Opin Biotechnol 6: 12-19, Agrawal (1996) TIBTECH 14: 376-387]; Analoge wie Peptid-Nucleinsäuren können ebenfalls verwendet werden [vgl. z. B. Corey (1997) TIBTECH 15: 224-229, Buchardt et al. (1993) TIBTECH 11: 384-386].

[0178] Alternativ ist die Polymerasekettenreaktion (PCR) ein anderes wohlbekanntes Verfahren zum Nachweis kleiner Mengen von Zielnucleinsäuren. Der Test wird in: Mullis et al. [Meth. Enzymol. (1987) 155: 335-350], US-Patente 4,683,195 und 4,683,202 beschrieben. Zwei „Primer“-Nucleotide hybridisieren mit den Ziel-Nucleinsäuren und werden verwendet, um die Reaktion zu starten. Die Primer können Sequenzen umfassen, die nicht mit der Amplifizierungszielsequenz (oder ihrem komplementären Gegenstück) hybridisieren, um die Duplexstabilität zu unterstützen oder zum Beispiel um eine geeignete Restriktionsstelle einzubauen. Typischerweise flankiert eine solche Sequenz die gewünschte Neisseria-Sequenz.

[0179] Eine thermostabile Polymerase schafft unter Verwendung der ursprünglichen Zielnucleinsäuren als Matrize Kopien von Zielnucleinsäuren von den Primern. Nachdem eine Schwellenmenge der Zielnucleinsäuren durch die Polymerase erzeugt wurde, können sie durch traditionellere Verfahren wie Southern-Blot-Verfahren nachgewiesen werden. Wenn das Southern-Blot-Verfahren angewendet wird, hybridisiert die markierte Sonde an die Neisseria-Sequenz (oder ihr komplementäres Gegenstück).

[0180] mRNA oder cDNA kann auch mittels traditioneller Blotverfahren, die in Sambrook et al [vorstehend] beschrieben werden, nachgewiesen werden. mRNA oder cDNA, die unter Verwendung von Polymerase-Enzym von mRNA erzeugt wurde, kann gereinigt und unter Verwendung von Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Die Nucleinsäuren auf dem Gel werden dann auf einen festen Träger wie Nitrocellulose geblottet. Der feste Träger wird einer markierten Sonde ausgesetzt und dann gewaschen, um jegliche nicht hybridisierte Sonde zu entfernen. Als nächstes werden Duplexmoleküle nachgewiesen, welche die markierte Sonde enthalten. Typischerweise ist die Sonde mit einer radioaktiven Einheit markiert.

BEISPIELE FÜR BEVORZUGTE FRAGMENTE

[0181] Die in WO99/24578 offenbarten Proteinsequenzen wurden einer Computeranalyse unterzogen, um die antigenen Peptidfragmente innerhalb des Proteins in voller Länge vorherzusagen. Drei Algorithmen wurden in dieser Analyse verwendet:

- AMPHI Dieses Programm wurde verwendet, um T-Zell-Epitope vorherzusagen [Gao et al. (1989) J. Immunol. 143: 3007, Roberts et al. (1996) AIDS Res Hum Retrovir 12: 593, Quakyi et al. (1992) Scand J Immunol Erg. 11: 9] und ist im Protean-Paket von DNASTAR, Inc. (1228 South Park Street, Madison, Wisconsin 53715, USA) verfügbar.
- ANTIGENIC INDEX, wie von Jameson & Wolf (1988), The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants, CABIOS, 4: 181-186, offenbart.
- HYDROPHILIE, wie von Hopp & Woods (1981) Prediction of Protein antigenic determinants from amino acid sequences, PNAS, 78: 3824-3828, offenbart.

[0182] Tabelle I zeigt die bevorzugten Fragmente der Proteine, die in WO99/24578 offenbart werden. Die drei Algorithmen identifizieren oftmals dieselben Fragmente. Solche mehrfach identifizierten Fragmente werden besonders bevorzugt. Die Algorithmen identifizieren oftmals überlappende Fragmente. Die Erfindung umfasst explizit Fragmente, die aus der Kombination dieser überlappenden Fragmente entstehen. Fragmente, die durch eine einzelne Aminosäure getrennt sind, werden oftmals ebenfalls identifiziert. Die Erfindung umfasst auch Fragmente, welche die beiden Extreme solcher „angrenzender“ Fragmente umspannen.

TABELLE 1-192 Fragmente der in WO99/24578 offenbarten Proteine

[0183] Legende: Fragment #1 der vorliegenden Erfindung entspricht den Aminosäuren 9-18 des ORF1-1, der in WO99/24578 offenbart wird, etc.

Fragment#	WO99/24578 ORF	Algorithmus	Aminosäuren
1.	1-1	AMPHI	9-18
3.	1-1	AMPHI	53-57
4.	1-1	AMPHI	71-73
5.	1-1	AMPHI	83-87
8.	1-1	AMPHI	118-120
10.	1-1	AMPHI	162-168
11.	1-1	AMPHI	174-179
12.	1-1	AMPHI	191-193
13.	1-1	AMPHI	300-302
14.	1-1	AMPHI	351-354
15.	1-1	AMPHI	360-363
16.	1-1	AMPHI	368-372
17.	1-1	AMPHI	381-384

20.	1-1	AMPHI	494-497
21.	1-1	AMPHI	501-503
22.	1-1	AMPHI	545-549
23.	1-1	AMPHI	650-657
24.	1-1	AMPHI	678-680
25.	1-1	AMPHI	696-700
26.	1-1	AMPHI	709-711
27.	1-1	AMPHI	732-741
28.	1-1	AMPHI	748-752
29.	1-1	AMPHI	771-775
30.	1-1	AMPHI	794-796
31.	1-1	AMPHI	809-811
32.	1-1	AMPHI	874-878
33.	1-1	AMPHI	926-932
34.	1-1	AMPHI	934-939
35.	1-1	AMPHI	972-977
36.	1-1	AMPHI	1001-1004
37.	1-1	AMPHI	1007-1014
38.	1-1	AMPHI	1055-1059
39.	1-1	AMPHI	1064-1069
40.	1-1	AMPHI	1074-1076
41.	1-1	AMPHI	1084-1087
42.	1-1	AMPHI	1093-1108
43.	1-1	AMPHI	1153-1156
44.	1-1	AMPHI	1174-1178
45.	1-1	AMPHI	1182-1186
46.	1-1	AMPHI	1188-1192
47.	1-1	AMPHI	1197-1202
48.	1-1	AMPHI	1214-1224
49.	1-1	AMPHI	1228-1232
50.	1-1	AMPHI	1243-1246
51.	1-1	AMPHI	1261-1271
52.	1-1	AMPHI	1302-1305
53.	1-1	AMPHI	1391-1394
54.	1-1	AMPHI	1410-1415
55.	1-1	Antigener Index	1-23
56.	1-1	Antigener Index	55-64
57.	1-1	Antigener Index	66-87

59.	1-1	Antigener Index	115-120
60.	1-1	Antigener Index	124-161
61.	1-1	Antigener Index	168-175
62.	1-1	Antigener Index	178-218
63.	1-1	Antigener Index	229-231
64.	1-1	Antigener Index	233-241
65.	1-1	Antigener Index	246-256
66.	1-1	Antigener Index	260-270
67.	1-1	Antigener Index	276-279
68.	1-1	Antigener Index	293-299
69.	1-1	Antigener Index ...	301-308
70.	1-1	Antigener Index ..	316-319
71.	1-1	Antigener Index	322-359
72.	1-1	Antigener Index	367-375
73.	1-1	Antigener Index	383-394
74.	1-1	Antigener Index	396-405
75.	1-1	Antigener Index	410-415
76.	1-1	Antigener Index	425-435
77.	1-1	Antigener Index	441-448
78.	1-1	Antigener Index	455-467
79.	1-1	Antigener Index	471-486
80.	1-1	Antigener Index	490-501
82.	1-1	Antigener Index	516-525
84.	1-1	Antigener Index	546-554
85.	1-1	Antigener Index	559-566
86.	1-1	Antigener Index ...	570-591
87.	1-1	Antigener Index	593-608
88.	1-1	Antigener Index	615-621

90.	1-1	Antigener Index	632-640
91.	1-1	Antigener Index	642-650
92.	1-1	Antigener Index	653-667
93.	1-1	Antigener Index	671-690
94.	1-1	Antigener Index	693-710
95.	1-1	Antigener Index	719-722
96.	1-1	Antigener Index	727-748
97.	1-1	Antigener Index	752-764
98.	1-1	Antigener Index	779-790
99.	1-1	Antigener Index	793-799
100.	1-1	Antigener Index	815-827
101.	1-1	Antigener Index	829-835
102.	1-1	Antigener Index	843-849
104.	1-1	Antigener Index	860-862
105.	1-1	Antigener Index	869-904
106.	1-1	Antigener Index	914-944
107.	1-1	Antigener Index	948-957
108.	1-1	Antigener Index	961-970
109.	1-1	Antigener Index	980-994
110.	1-1	Antigener Index	1000-1008
111.	1-1	Antigener Index	1013-1027
112.	1-1	Antigener Index	1034-1037
113.	1-1	Antigener Index	1045-1054

114.	1-1	Antigener Index	1056-1083
115.	1-1	Antigener Index	1090-1113
116.	1-1	Antigener Index	1117-1160
117.	1-1	Antigener Index	1162-1175
118.	1-1	Antigener Index	1177-1184
119.	1-1	Antigener Index	1197-1211
120.	1-1	Antigener Index	1215-1238
121.	1-1	Antigener Index	1240-1250
122.	1-1	Antigener Index	1256-1273
123.	1-1	Antigener Index	1286-1288
124.	1-1	Antigener Index	1293-1295
125.	1-1	Antigener Index	1297-1314
126.	1-1	Antigener Index	1321-1329
127.	1-1	Antigener Index	1334-1337
128.	1-1	Antigener Index	1345-1352
129.	1-1	Antigener Index	1363-1379
130.	1-1	Antigener Index	1391-1403
131.	1-1	Antigener Index	1410-1419
132.	1-1	Antigener Index	1424-1427
133.	1-1	Antigener Index	1437-1450
134.	1-1	Hydrophilie	1-23
135.	1-1	Hydrophilie	56-64
136.	1-1	Hydrophilie	66-82
137.	1-1	Hydrophilie	84-86
138.	1-1	Hydrophilie	124-136
139.	1-1	Hydrophilie	140-151
140.	1-1	Hydrophilie	168-175
141.	1-1	Hydrophilie	180-187
142.	1-1	Hydrophilie	190-199
143.	1-1	Hydrophilie	202-217
144.	1-1	Hydrophilie	237-239
145.	1-1	Hydrophilie	246-252
146.	1-1	Hydrophilie	263-268
147.	1-1	Hydrophilie	276-279
148.	1-1	Hydrophilie	302-304
149.	1-1	Hydrophilie	324-328
150.	1-1	Hydrophilie	331-359
151.	1-1	Hydrophilie	369-375
152.	1-1	Hydrophilie	385-393
153.	1-1	Hydrophilie	396-405
154.	1-1	Hydrophilie	428-432
155.	1-1	Hydrophilie	441-447
156.	1-1	Hydrophilie	455-464
157.	1-1	Hydrophilie	471-477

158.	1-1	Hvdrophilie	490-501
159.	1-1	Hydrophilie	519-523
161.	1-1	Hydrophilie	548-554
162.	1-1	Hydrophilie	560-566
163.	1-1	Hydrophilie	571-577
164.	1-1	Hydrophilie	582-591
165.	1-1	Hydrophilie	596-606
166.	1-1	Hvdrophilie	615-621
168.	1-1	Hydrophilie	658-667
169.	1-1	Hydrophilie	679-686
170.	1-1	Hydrophilie	697-703
172.	1-1	Hvdrophilie	737-748
173.	1-1	Hvdrophilie	752-756
174.	1-1	Hydrophilie	761-764
175.	1-1	Hydrophilie	782-788
176.	1-1	Hydrophilie	843-849
177.	1-1	Hvdrophilie	860-862
178.	1-1	Hydrophilie	869-873
179.	1-1	Hydrophilie	878-892
180.	1-1	Hydrophilie	916-922
181.	1-1	Hvdrophilie	927-943
182.	1-1	Hydrophilie	950-956
183.	1-1	Hydrophilie	964-967
184.	1-1	Hvdrophilie	981-993
185.	1-1	Hydrophilie	1002-1008
186.	1-1	Hydrophilie	1015-1025
187.	1-1	Hydrophilie	1034-1037
188.	1-1	Hydrophilie	1045-1054
189.	1-1	Hvdrophilie	1056-1083
190.	1-1	Hydrophilie	1090-1111
191.	1-1	Hydrophilie	1117-1144
192.	1-1	Hydrophilie	1149-1159
193.	1-1	Hydrophilie	1165-1174
194.	1-1	Hvdrophilie	1197-1210
195.	1-1	Hvdrophilie	1215-1238
196.	1-1	Hydrophilie	1243-1249
197.	1-1	Hydrophilie	1257-1269
198.	1-1	Hydrophilie	1271-1273
199.	1-1	Hydrophilie	1301-1304
200.	1-1	Hydrophilie	1306-1314
201.	1-1	Hydrophilie	1321-1325

202.	1-1	Hydrophilie	1346-1352
203.	1-1	Hydrophilie	1364-1371
204.	1-1	Hydrophilie	1373-1375
205.	1-1	Hydrophilie	1395-1403
206.	1-1	Hydrophilie	1411-1419
208.	1-1	Hydrophilie	1437-1447

[0184] Es versteht sich, dass die Erfindung vorstehend nur beispielhaft beschrieben wird und Modifizierungen gemacht werden können, solange sie im Umfang der Erfindung bleiben.

Patentansprüche

1. Protein, umfassend ein Fragment von SEQ ID 650 aus WO99/24578:

MKTTDKRTTETHRKAPKTGRIRFSPAYLAICLSFGILPQAWAGHTYFGINYQY
 YRDAENKKGKFAVGAKDIEVYNKKGELVGKSMKAPMIDFSVVS RNGVAAL
 VGDQYIVSVAHNGGYNNVDFGAEGRNPDQHRFTYKIVKRNNYKAGTKGHPY
 GGDYHMPRLHKFVTD AEPVEMTSYMDGRKYIDQNNYPDRVRIGAGRQYWRS
 DEDEPNNRESSYHIASAYS WL VGGNTFAQNGSGGGTVNLGSEKIKHSPYGF LP
 TGGSF GDSGSPMFIYDAQKQKWLINGVLQTGNPYIGKSNGFQLVRKDWFYDEI
 FAGDTHSVFYEP RQNGKYSFNDDNNGTGKINAKHEHNSLPNRLKTRTVQLFN
 VSLSETAREPVYHAAGGVNSYRPRLNNGENISFIDEKGKELILTSNINQGAGGL
 YFQGDFTVSPENNETWQGAGVHISEDSTVTWKVNGVANDRLSKIGKGT LHVQ
 AKGENQGSISVGDGT VILDQQADDKGGKQAFSEIGLVSGRGT VQLNADNQFNP
 DKLYFGFRGGRLDLNGHSLSFHRIQNTDEGAMIVNHNQDKESTVTITGNKDIA
 TTGNNNSLDSKKEIAYNGWFG EKDTTKTNGRLNLVYQPAAEDRTLLL SGGTN
 LNGNITQTNGK LFFSGRPTPHAYNHLNDHWSQKEGIPRGEIVWDNDWINRTFK
 AENFQIKGGQAVVSRNVAKVKG DWHL SNHAQAVFGVAPHQSHTICTRSDWT
 GLTNCVEKTITDDKVIASLT KTDISGNVDLADHAHLNLTGLATLNGNLSANGD
 TRYTVSHNATQNGNLSLVGNAQATFNQATLNGNTSASGNASFNLSDHAVQNG
 SLT LSGNAKANVSHSALNGNVSLADKAVFHFESSRFTGQISGGKDTALHLKDS
 EWTLP SGTELGNLNL DNATITLNSAYRHDAAGAQTGSATDAPRRRSRRSRRSL
 LSVTPPTS VESRFNTLT VNGKLNGQGTFRFMSELF GYRSDKLKLAESSEGT YTL
 AVNNTGNEPASLEQLTVVEGKDNKPLSENLF TLQNEHVDAGAWRYQLIRKD
 GEFRLHNPVKEQELSDKL GKAEAKKQAEKD NAQSLDALIAAGRDAVEKTESV
 AEPARQAGGENVGIMQAEEEEKKRVQADKDTALAKQREAE TRPATTAFPRARR
 ARRDL PQLPQPQPQQRDLISRYANSGLSEFSATLNSVF AVQDELDRVFAEDR
 RNAVWTS GIRD TKHYRSQDFRAYRQQTDLRQIGMQKNLGSGRVGILFSHNRT
 ENT FDDGIGNSARLAHGAVFGQYGIDRFYIGISAGAGFSSGSLSDGIGGKIRRRV
 LHYGIQARYRAGFGGFGIEPHIGATRYFVQKADYRYENVNIATPGLAFNRYRA
 GIKADYSFKPAQHISITPYLSLSYTD AASGKVRTRVNTAVLAQDFGKTRSAEW
 GVN AEIKGFTLSLHAAA AKGPQLEAQHSAGIKLGYRW

wobei das Fragment:

(a) ein oder mehrere der Aminosäurefragmente 9-18, 71-73, 83-87, 118-120, 174-

179, 191-193, 351-354, 360-363, 368-372, 381-384, 494-497, 545-549, 650-657, 696-700, 709-711, 732-741, 748-752, 771-775, 809-811, 874-878, 926-932, 934-939, 972-977, 1001-1004, 1007-1014, 1055-1059, 1064-1069, 1074-1076, 1084-1087, 1093-1108, 1153-1156, 1182-1186, 1188-1192, 1197-1202, 1214-1224, 1228-1232, 1243-1246, 1261-1271, 1302-1305, 1391-1394, 1410-1415, 1-23, 66-87, 115-120, 124-161, 168-175, 178-218, 229-231, 233-241, 246-256, 260-270, 276-279, 293-299, 301-308, 316-319, 322-359, 367-375, 383-394, 396-405, 410-415, 425-435, 441-448, 455-467, 471-486, 490-501, 516-525, 559-566, 570-591, 593-608, 615-621, 632-640, 642-650, 653-667, 671-690, 693-710, 719-722, 727-748, 752-764, 779-790, 793-799, 815-827, 829-835, 843-849, 860-862, 869-904, 914-944, 948-957, 961-970, 980-994, 1000-1008, 1013-1027, 1034-1037, 1045-1054, 1056-1083, 1090-1113, 1117-1160, 1162-1175, 1177-1184, 1197-1211, 1215-1238, 1240-1250, 1256-1273, 1286-1288, 1293-1295, 1297-1314, 1321-1329, 1334-1337, 1345-1352, 1363-1379, 1391-1403, 1410-1419, 1424-1427, 1437-1450, 56-64, 66-82, 124-136, 140-151, 180-187, 190-199, 202-217, 237-239, 246-252, 263-268, 324-328, 331-359, 369-375, 385-393, 428-432, 441-447, 455-464, 471-477, 519-523, 560-566, 571-577, 582-591, 596-606, 658-667, 697-703, 737-748, 752-756, 761-764, 782-788, 869-873, 878-892, 916-922, 927-943, 950-956, 964-967, 981-993, 1002-1008, 1015-1025, 1090-1111, 1117-1144, 1149-1159, 1165-1174, 1197-1210, 1243-1249, 1257-1269, 1271-1273, 1301-1304, 1306-1314, 1321-1325, 1346-1352, 1364-1371, 1373-1375, 1395-1403, 1411-1419, 1437-1447, 53-64, 162-175, 174-218, 300-308, 381-394, 490-503, 545-554, 560-566, 642-657, 650-667, 693-711, 727-752, 748-764, 1000-1014, 1007-1027, 1162-1178, 1174-1184, 1214-1238, 300-304, 368-375, 545-554, 678-686, 696-703, 732-748, 748-756, 874-882, 926-943, 1001-1008, 1002-1014, 1055-1083, 1165-1178, 1287-1771, 1261-1273, 1301-1305, 926-939, 1182-1192, 1162-1184, 229-241, 293-308, 383-405, 570-608, 632-650, 815-835, 1045-1083, 1117-1175, 1162-1184, 1215-1250, 1293-1314, 56-82, 66-86, 1257-1273, 1301-1314 und/oder 1364-1375 aus SEQ ID 650 umfasst,

und

(b) mindestens eine antigene Determinante von SEQ ID 650 umfasst, und

(c) nicht mehr als 1456 Aminosäuren von SEQ ID 650 hat, und

(d) nicht mehr als 1449 Aminosäuren von SEQ ID 648 aus WO99/24578 hat

```

1 MKTTDKRTTE THRKAPKTGR IRFXAAYLAI CLSEFGILPQA WAGHTYFGIN
51 YQYYRDFAEH KQKFAVGAKD IEVYNKKGEL VGKSMTKAPM IDFSVVS RNG
101 VAALVGQYI VSVAHNGGYN NVDFGAEGXN IXDOXRXTYK IVKRNMYKAG
151 TKGHPYGGDY HMPRLHKXVT DAEPVEMTSY MDGRKYIDQN NYPDVRIGA
201 GRQYWRSDDE EPNNRESSYH IAS.....GS PMFIYDAQKQ
251 KWLINGVLQT GNPYIGKSNG FQLVRKDWFY DEIFAGDTHS VFYEPRQNGK
301 YSFNDNNNGT GKINAKHEHN SLPNRLKTRT VQLFNVSLSL TAREPVYHAA
351 GGVNSYRPRL NNGENISFID EGKCELILTS NINQGAGGLY FQGDFTVSPE
401 NNETWQAGAV HISEDSTVTW KVNGVANDRL SKIGKGTLL.....
//
701 .....DKVTAS LTKTDISGNV DLADHAHLNL TGLATLNGNL
751 SANGDTRYTV SHNATONGNX SLVXNAQATF NQATLNGNTS ASGNASFNLS
801 DHAVQNGSLT LSGNAKANVS HSALNGNVSL ADKAVFHFS SRFTGQISGG
851 KDTALHLKDS EWTLP SGXEL GNINLNDNATI TLNSAYRDA ACAQTGSATD
901 APRRRSRRSR RSLXVTPPT SVESRFTLT VNGKLNQGT FRFMSELEFGY
951 RSDKLKLAES SEGTYTLAVN NTGNEPASLE QLTVEGKDN KPLSENLFNT
1001 LQNEHVDACA W.....
//
1151 .....LDRVFAEDR
1201 RNAVNTSGIR DTKHYRSQDF RAYRQQTDLR QIGMQKNLGS GRVGILFSHN
1251 RTENTFDDGI GNSARLAHGA VFGQYIDRF YIGISAGAGF SSGSLSDGIG
1301 KXKRRRVLHY GIQARYRAGF GGFIEPHIG ATRYFVQKAD YRYENVNIAT
1351 PGLAFNRYRA GIKADYSFKP AQHISITPYL SLSYTDAAAG KVRTRVNTAV
1401 LAQDFGKTRS AEWGVNAEIK GFTLSLHAAA AKGPQLEACH SAGIKLGYRW, und

```

(e) nicht mehr als 1448 Aminosäuren von SEQ ID 652 aus WO99/24578 hat

```

1 MKTTDKRTTE THRKAPKTGR IRFSPAYLAI CLSEFGILPQA WAGHTYFGIN
51 YQYYRDFAEH KQKFAVGAKD IEVYNKKGEL VGKSMTKAPM IDFSVVS RNG
101 VAALVGQYI VSVAHNGGYN NVDFGAEGXN PDQHRFSYQI VKRNMYKPDN
151 SHPYNGDXHM PRLHKFVTD AEPVEMTSY GNTYSDKEKY PERVRIGSGH
201 HYWRYDDDKH GDLSYSGAWL IGCNTHMQGW GNNGVXSLSG DVRHANDYGP
251 MPIAGAAGDS GSPMFLYDKT NNKWLNGVL QTGYPSGRE NGFQLIRKDW
301 FYDDIYRGDT HTVXFEP RSN GHFSFTSNNN GTSTVTETNE KVSNPKLKVO
351 TVRLEDESLN ETDKEFVYAA GGVNQYRPRL NNGENLSFID YGNGKLILSN
401 NINQGAGGLY FEGDETVSPE NNETWQAGAV HISEDSTVTW KVNGVANDRL
451 SKIGKGTLLHV QAKGENQCSI SVGDGTVILD QQADDKGGKQ AFSEIGLXSG
501 RGTVQLNADN QFNPDKLYEG FRGGRDLNG HSLSFHRIQN TDEGAMIXXH
551 NATTTSTVTI TGNE SITQPS GKNINRLNYS KEIAYNGWFG EKOTTKTNGR
601 LNLVYQPAAE DRTXLLSGGT NLNGNITQTN GKLEFFSGRPT PHAYNHLGSG
651 WSKMEGIPQG EJVWDNDWIX RTFKAENFHI QGGQAVISRN VAKVEGD XHL
701 SNHAQAVFGV APHQSHTICT RSDWTGLTNC VEXXITDDKV IASLTKTDXS
751 GXVXLXXXXX XKLXGXAXLK GNLSANGDTR YTVSHNATQN GNLSLVGNAQ
801 ATFNQATLNG NXSXSGNASF NLSNNAQNG SLTSLDNAKA NVSHSALNGN
851 VSLADKAVFH FENSRTGQL SGSKXTALHL KDSEWTLPSG TELGNLNDN
901 ATITLNSAYR HDAAGAQTGX VSDTPRRRSR RSLSVTPPT SVESRFTLT
951 VNGKLNQGT FRFMSELEFGY RSDKLKLAES SEGTYTLAVN NTGNEPVSLD

```

1001 QLTVEGKDN KPLSENINFT LQNEHVDAGA WRVQLIRKDG EFRLHNPVKE
 1051 QELSDKLCKA EAKKQAEKDN AQSLDALIA GRDAAEKTES VAEPAKXAGG
 1101 ENVGIMQAE EKKRVQADK SALAKQREAE TRFXTTAFPR ARXAKRDLPO
 1151 PQPQPQPQPQ PQDLXSRYA NSGLSEFSAT LNSVFAVQDE LDRVFAEDRR
 1201 NAVWTSXIRX TKHYRSQDFR AYRQQTDLRQ IGMQKNLGSG RVGILFSHNR
 1251 TENXFDDGIG NSARLAHGAV FGQYGIGRFD IGISTGAGFS SEXLSDGIGG
 1301 KIRRAVLHYG IQARYRAGFG GFGIEPYIGA TRYFVQKADY RYENVNIATP
 1351 GLAFNRYRAG IKADYSFKPA QHXSITPYXS LSYTDAASGK VRTRVNTAVL
 1401 AQDFGKTRSA EWGVNAEIKG FTLSXHAAA KGPQLEAQHS AGIKLGYRW, und

(f) nicht mehr als 1467 Aminosäuren von SEQ ID 654 aus WO99/24578 hat

1 MKTTDKRTTE THRKAETGR IRFSPAYLAI CLSEGILPQA RAGHTYFGIN
 51 YQYYRDEFAEN KGRFAVGAKD IEVYNKKGEL VGKSMTKAPM IDFSVVSRRNG
 101 VAALAGDQYI VSAHNGGYN NVDFGAEGSN PQHRFSYQI VKRNNYKAGT
 151 NGHPYGGDYH MPRLHKFVTD AEPVEMTSYM DGWKYADLNK YPDRVRIGAG
 201 RQYWRSEDEE PNNRESSYHI ASAYSWLVGG NTEAQNQSGG GTVNLGSEKI
 251 KHSFYGFLPT GGSFGDSGSP MFIYDAQKQK WLINGVLQTG NPYIGKSNFG
 301 QLVRKDNFYD EIFAGDTHSV FYEPHQNGKY FENDNMNGAG KIDAKHKHYS
 351 LPYRLKTRTV QLFNVSLSET AREPVYHAAG GVNSYRPRIN NGENISFIDK
 401 GKELILTSN INQAGGLYF EGNFTVSPKN NETWQAGVH ISDGSTVTWK
 451 VNGVANDRLS KIGKGTLLVQ AKGENQGSVS VGDGKVILDQ QADDQGGKQA
 501 FSEIGLVSGR GTVQLNADNQ FNPDKLYFGF RGGRLDLNGH SLSFHRICNT
 551 DEGAMIVMHN QDKESTVTIT GNKDITTTGN NNNLDSKKEI AYNGWFGEKD
 601 ATKTNGLNL NYPPEADRT LLLSGGTNLN GNITQTNGKL FFSGRPTPHA
 651 YNHLGSGWSK MEGIPQGEIV WDNDWIDRTF KAENFHIQGG QAVVSRNVAK
 701 VEGDWHLSNH AQAVFGVAPH QSHTICTRSO WTGLTSCTEK TITDQKVIAS
 751 LSKTDVRGNV SLADHAHLNL TGLATENGNL VQAETRTIRL RANATQNGNL
 801 SLVGNAQATF NQATLNGNTS ASDNASFNLS NNAVQNGSLT LSDNAKANVS
 851 HSAINGNVSL ADKAVFHEEN SRFTGKISGG KDTALHLKDS EWTLPSTEL
 901 GNLNLDNATI TLNSAYRHDA AGAQTGSAAD APRRRSRRLS LSVTPPTSSE
 951 SRFTLTVNG KLNGQGTFRF MSELFGYRSG KLKLESSEG TYTLAVNNTG
 1001 NEPVSLQLT VVEGKDKTPL SENLNFTLQN EHVDAGAWRY QLIRKDGSEFR
 1051 LHPVKEQEL SDKLGKAGET EAALTAKQAQ LAAKQQAED KAQSLDALIA
 1101 AGRNATEKAE SVAEPARQAG GENAGIMQAE EKKRVQADK DTALAKQREAE
 1151 ETRPATTAFR RARRARADLP QPQPQPQPQP QBDLISRYAN SGLSEFSATL
 1201 NSVFAVQDEL DRVFAEDRRN AVWTSIGIRD KHYSQDFRA YRQQTDLRQI
 1251 GMQKNLGSGR VGILFSHNR GTTFDDGIGN SARLAHGAVF GQYGIGRFDI
 1301 GISAGAGFSS GSLSDGIRGK IRRRAVLHYG QARYRAGFG FGIEPHIGAT
 1351 RYFVQKADYR YENVNIATPG LAFNRYRAGI KADYSFKPAQ HISITPYLSL
 1401 SYTDAASGKV RTRVNTAVLA QDFGKTRSAE WGVNAEIKGF TISLHAAA
 1451 GPQLEAQHSA GIKLGYRW, und

(g) nicht SEQ ID 2

MKTTDXRTTETHRKAPKIGRIRFSPAYLAICLSFGILPQAWAGHTYFGIN YQYYRDEFAEN
 KGRFAVGAKDIEVYNKKGELVGKSMTKAPMIDFSVVSRRNGVAALVGDCYTVSAHNGGYN
 NVDFGAEGSNPDQHRFSYQIVKRNNYKAGTNOHPYGGDYHMPRLHKFVTD AEPVEMTSYM
 DGRKYIDQNNYPDRVRIGAGRQYWRSEDEEPNNRESSYHIASAYSWLVGGNTFAQNQSGG
 GTVNLGSEKIKHSPYGFPLPTGGSEGDSQSPMFIYDAQKQKILINGVLQTG NPYIGKSNFG
 QLVRKDNFYDEIFAGDTHSVFYEPHQNGKYTFENDNMNGAGKIDAKHEHNSLPNRLKTRTV
 QLFNVSLSETAREPVYHAAGGVNSYRPRINNGENISFIDEGKELILTSNINQAGGLYF
 QGDTVSPENNNETWQAGVHISEDSTVTWKNQVANDRLSKIGKGTLLVQAKGENOGSIS
 VGDGKVILDQADENNEKQAPSEIGLVSGRGTVQLNADNQFNPDKLYFGFRGGRLDLNGH
 SLSFHRICNTDEGAMIVMHNQDKESTVTITGNKDITTTGNNSLDSKKEIAYNGWFGEKD
 TTKTNGRLNLVYQPAEDRTLLLSGGTNLNGNITQTNGKLFFSGRPTPHAYNHLGSGWSK
 MEGIPQGEIVWDNDWIDRTFKAENFHIQGGQAVISRNVAKVEGDWHLSNHAQAVFGVAPH

QSHITICTRSDWTGLTNCVEKTIITDDKVIASLTKTDISGNVSLADRAHLNLTGLATLNGNL
 SANGDTRYTVSHNATQNGDLSLVGHAQATFNQATLNGNTSASGNASFNLSKNAVQNGSLT
 LSGNAKANVSHSALNONVSLADKAVFHFESSRFTGQISGSKDTALHLKDSWTLPSGTTEL
 GNLNLDNATITLNSAYRHDAAGAQTSATDAPRRRSRRSLLSVTPPASAESHFNTLTVNG
 KLNQOQGTFRFMSELFYGRSDKLKLAESSEGTYYTLAVNMTGNEPVS LDQLTVVEGKDNKPL
 SENLNFLLQNEHVDAGAWRYQLIRKDGFEFLHNPVKEQELSDKLOKAEAKKQAGKDNAQS
 LDALIAAGRDAVEKTESVAEPARQAGGENVGIWQAESEKRVQADKDTALAKQREGKTHP
 ATTAFPRARRARRDLPOPOPOPOPOPOQORDLISRYANSGLSEFSATLNSVEAVQDELDRVF
 AEDRRNAVVTSGIRDTKHYRSQDFRAYROOTDLRQIGMOKNLGSGRVGILFSHNRTEFTF
 DDGIGNSARLANCAVFCQYQIGRFDIGISTGAGFSSGSLSDDIGSKIRRRVLHYGIOARY
 RAGFGGFGIEPHIGATRYFVQKADYRYENVNIATPGLAFNRYRAGIKADYSFKPAQHIS I
 TPYLSLSYTDAAASGKVRTRVNTAVLAQDFGKTRSAEWGVNAEIKGFTLSLHAAAAGKGPOL
 EAQHSAGIKLGYRW

oder SEQ ID 4 aus WO99/55873 ist

MKTIDERTTETTERKAPETGRIRFSPAYLAICLSFGILPQAMAGHTYFGINYOXYRDFAEK
 KGEFAVQAKDIEVYNKEGELVGSMTXAPMIDFSVVRNGVAALVGDQYIVSAHNGGYN
 NVDFGABGRNPDQHRFTYKIVKBNYKAGTKGHPYGGDYIEMPRLNKFTVDAEPVENTSYM
 DGRKYIDQNNYFDRVRIGAGROYWREDEDEPNKRESSYHIASAYSWLVGNGTFAQNGSCG
 GTVNLQSEKIKHSPYGFLLPTGGSFGDSQSPMFIYDAQKQKNLNGVLQGTNPYIGKSNGP
 QLVKNDWFYDEIFAGDTHSVFYEPQNGKYSFNDDNNGTGKINAKIENHSLPNRLKTRTV
 OLFNVLSLSETAREPVYIAAGGVNSYRPRELNGENISFIDEGRGELILTSNINQAGGLYF
 QGDFTVSPENNETWQAGVHISEDSVTWTKVNCVANDRLSKIGKOTLHVQAKGENOGSIS
 VGDGTVILDQADDKGEKQAFSEIGLVSGRGTVQLNADNQPNPDKLYFGFRGGRDLNNGH
 SLSPHRIQNTDEGAMIWVHNQDKESTVTITGNKDATTGNMNSLDGRKEIZAYNGWFGCKD
 TTKTNGRLNLVYQPAEDRTLILSGGTNLNGNITOTNGKLEFFSGRPTPHAYNHLNDHWSQ
 KEGI PRGETVWQNDWINRTFKAENFOIEGGQAVYSRNVAKVKGDNHLSNHAQAVFGVAPH
 QSHITICTRSDWTGLTNCVEKTIITDDKVIASLTKTDISGNVSLADRAHLNLTGLATLNGNL
 SANGDTRYTVSHNATQNGDLSLVGHAQATFNQATLNGNTSASGNASFNLSDHAVQNGSLT
 LSGNAKANVSHSALNONVSLADKAVFHFESSRFTGQISGSKDTALHLKDSWTLPSGTTEL
 GNLNLDNATITLNSAYRHDAAGAQTSATDAPRRRSRRSRRSLLSVTPPTS VESRFTLT
 VNGKLNQOQGTFRFMSELFYGRSDKLKLAESSEGTYYTLAVNMTGNEPVS LDQLTVVEGKDN
 KPLSENFNFTLQNEHVDAGAWRYQLIRKDGFEFLHNPVKEQELSDKLOKAEAKKQAEKDN
 AQSLDALIAAGRDAVEKTESVAEPARQAGGENVGIWQAESEKRVQADKDTALAKQREAE
 TRPATTAFPRARRARRDLPOLOPOPOPOPOQORDLISRYANSGLSEFSATLNSVFAVQDELD
 RVEAEERRNAVVTSGIRDTKHYASQDFRAYROOTDLRQIGMOKNLGSGRVGILFSHNRTE
 NTPDDGIGNSARLANCAVFCQYQIGRFDIGISTGAGFSSGSLSDDIGSKIRRRVLHYGIO
 ARYRAGFGGFGIEPHIGATRYFVQKADYRYENVNIATPGLAFNRYRAGIKADYSFKPAQH
 ISITPYLSLSYTDAAASGKVRTRVNTAVLAQDFGKTRSAEWGVNAEIKGFTLSLHAAAAGK
 GPOLLEAQSAGIKLGYRW

2. Nucleinsäure, die das Protein nach Anspruch 1 codiert.

3. Zusammensetzung, umfassend das Protein nach Anspruch 1 oder die Nucleinsäure nach Anspruch 2, wobei die Zusammensetzung ein Impfstoff, ein diagnostisches Reagens oder eine immunogene Zusammensetzung ist.

4. Zusammensetzung nach Anspruch 3 zur Verwendung als Medikament.

5. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 oder der Nucleinsäure nach Anspruch 2, für die Herstellung (i) eines Medikaments zur Behandlung oder Vorbeugung einer Infektion durch Neisseria-Bakterien, (ii) eines diagnostischen Reagens zum Nachweis der Anwesenheit von Neisseria-Bakterien oder von Antikörpern gegen Neisseria-Bakterien und/oder (iii) eines Reagens, das Antikörper gegen Neisseria-Bakterien hervorrufen kann.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen