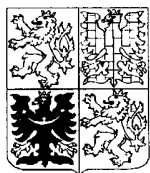


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **07.05.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **13.05.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/9810276**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.05.2001**
(Věstník č. 5/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/EP99/03255**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/58683**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 4202

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/31 A 61 P 31/04
C 07 K 14/22
C 07 K 16/12
A 61 K 39/095
A 61 K 48/00
C 12 N 5/10
C 12 Q 1/68
G 01 N 33/53

(71) Přihlašovatel:

SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S. A.,
Rixensart, BE;

(72) Původce:

Ruelle Jean-Louis, Rixensart, BE;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Izolovaný polypeptid

(57) Anotace:

Polypeptidy BASB029 a polynukleotidy kódující tyto polypeptidy BASB029 a způsoby výroby těchto polypeptidů rekombinantními technikami. Poskytují se také diagnostická, profylaktická a terapeutická použití proti bakteriálním infekcím.

Izolovaný polypeptid

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká polynukleotidů (dále zde označovaných jako „polynukleotid (polynukleotidy) BASB029“ nebo
5 „BASB029“, polypeptidů kódovaných těmito nukleotidy (dále zde označovaných jako „BASB029“ nebo „polypeptid (polypeptidy) BASB029“), rekombinantních materiálů a způsobů jejich výroby. Další provedení se týká způsobů použití těchto polypeptidů a polynukleotidů včetně vakcín proti bakteriálním infekcím. V dalším provedení se
10 vynález týká diagnostických testů pro detekci infekce některými patogeny.

Dosavadní stav techniky

Neisseria meningitidis (meningokok) je gramnegativní bakterie,
15 která se často izoluje z lidského horního respiračního traktu. Příležitostně způsobuje invazivní bakteriální onemocnění jako je bakteremie a meningitida. Výskyt meningokokového onemocnění vykazuje geografické sezónní a meziroční rozdíly (Schwartz, B., Moore, P. S, Broome, C. V.; Clin. Microbiol. Rev. 2 (dodatek), S18 -
20 S24, 1989). Většina onemocnění v zemích mírného pásma je způsobena kmeny sérotypu B a četnost jejich výskytu v celkové populaci kolísá v rozmezí 1 až 10/100 000 obyvatel/rok (Kaczmarek, E. B. (1997), Commun. Dis. Rep. Rev. 7: R55 - 9, 1995; Scholten, R. J. P. M, Bijlmer, H. A, Poolman, J. T. a další, Clin. Infect. Dis. 16: 237
25 - 246, 1993; Cruz, C., Pavez, G., Aguilar, E., a další, Epidemiol. Infect., 105: 119 - 126, 1990).

Většinou v centrální Africe se vyskytují epidemie s převažující séroskupinou A meningokoků, přičemž někdy je četnost výskytu až

1000/100 000 obyvatel/rok (Schwartz, B., Moore, P. S, Broome, C. V., Clin. Microbiol. Rev. 2 (dodatek), S18 - S24, 1989). Téměř všechny případy meningokokového onemocnění jsou způsobeny meningokoky séro skupiny A, B, C, W-135 a Y a v současnosti je dostupná
5 tetra valentní polysacharidová vakcína A, C, W-135, Y (Armand, J., Arminjon, F., Mynard, M. C, Lafaix, C., J. Biol. Stand. 10: 335 - 339, 1982).

Polysacharidové vakcíny se v současnosti stále zlepšují jejich chemickou konjugací s nosnými proteiny (Lieberman, J. M, Chiu, S. S.,
10 Wong, V. K., a další, JAMA 275: 1499 - 1503, 1996).

Vakcína pro séro skupinu B není dostupná, protože bylo zjištěno, že kapsulární polysacharid typu B je neimunogenní, pravděpodobně proto, že má strukturní podobnost se složkami hostitelského organismu (Wyle, F. A, Artenstein, M. S., Brat, M. L. a další, J. Infect.
15 Dis. 126: 514 - 522, 1972; Finne, J. M., Leinonen, M., Makela, P. M., Lancet ii.: 355 - 357, 1983).

Již mnoho let byla prováděna řada výzkumů s cílem vyvinout vakcíny založené na vnější membráně meningokoků (de Moraes, J. C., Perkins, B., Camargo, M. C. a další, Lancet 340: 1074 - 1078, 1992;
20 Bjune, G., Hoiby, E. A., Gronnesby, J. K. a další, 338: 1093 - 1096, 1991). Některé vakcíny prokázaly účinnost u starších dětí (> 4 roky) a u dospívajících od 57 % do 85 %.

V těchto vakcínách je přítomno mnoho složek vnější membrány bakterií, jako je PorA, PorB, Rmp, Opc, Opa, FrpB a příspěvek těchto
25 jednotlivých složek k pozorované ochraně stále vyžaduje další definice. Použitím zvířecích nebo lidských protilátek se ukázalo, že některé složky vnější membrány bakterií jsou potenciálně vhodné pro indukci ochranné imunity, jako je TbpB a NspA (Martin, D., Cadieux. N., Hamel, J., Brodeux, B. R, J. Exp. Med. 185: 1173 - 1183, 1997;
30 Lissolo, L., Maitre-Wilmotte, C., Dumas, P., a další, Inf. Immun. 63:

884 - 890, 1995). Mechanismy ochranné imunity zahrnují baktericidní aktivitu a opsonofagocytózu vyvolané protilátkou.

Pro kombinaci všech mechanismů zprostředkovaných protilátkami byl použit model zvířecí bakteremie (Saukkonen, K.,
5 Leinonen, M., Abdillahi, H., Poolman, J. T., Vaccine 7: 325 - 328, 1989). Obecně přijímaná domněnka je, že baktericidní mechanismus zprostředkovaný pozdní složkou komplementu je klíčový pro vyvolání imunity proti onemocnění meningokoky (Ross, S. C., Rosenthal P. J., Berberic, H. M., Densen, P. J., Infect. Dis. 155: 1266 - 1275, 1987).

10 Četnost infekcí *Neisseria meningitidis* v posledních několika desetiletích dramaticky vzrostla. Tento vzrůst byl připisován vzniku kmenů s vícečetnou rezistencí na antibiotika a rostoucím počtem lidí s oslabeným imunitním systémem. Není již neobvyklé izolovat kmeny *Neisseria meningitidis*, které jsou rezistentní na některá nebo všechna
15 standardní antibiotika. Tento jev vyvolal naléhavou potřebu nových antimikrobiálních prostředků, vakcín, způsobů pro systematické prozkoumávání léčiv a diagnostických testů na tento organismu.

Podstata vynálezu

20 Předkládaný vynález se týká BASB029, zvláště polypeptidů BASB029 a polynukleotidů BASB029, rekombinantních materiálů a způsobů jejich výroby. V dalším provedení se vynález týká způsobů použití těchto polypeptidů a polynukleotidů, včetně mj. prevence a léčení mikrobiálních onemocnění. V dalším provedení se vynález týká
25 diagnostických testů pro detekci onemocnění spojených s mikrobiálními infekcemi a stavy souvisejícími s těmito infekcemi, jako jsou testy pro detekci exprese nebo aktivity polynukleotidů nebo polypeptidů BASB029.

Ze znění následujícího popisu a jiných částí předkládané
30 přihlášky budou odborníkovi v oboru zřejmé i různé změny a

modifikace spadající rovněž do podstaty a rozsahu předkládaného vynálezu.

Podrobný popis vynálezu

5 Předkládaný vynález se týká polypeptidů a polynukleotidů BASB029, které se popisují podrobněji dále. Vynález se zvláště týká polypeptidů a polynukleotidů BASB029 bakterie *Neisseria meningitidis*, která je příbuzná homologií aminokyselinové sekvence s proteinem povrchových fibril (HSF) *Haemophilus influenzae*. Předkládaný vynález
10 se zvláště týká BASB029 s nukleotidovými a aminokyselinovými sekvencemi uvedenými v SEQ ID No.: 1, 3 a SEQ ID No.: 2, 4. Je zřejmé, že sekvence uváděné ve výpisech sekvencí níže jako „DNA“, znamenají příklad jednoho provedení vynálezu, protože odborníkovi s běžnou znalostí oboru bude jasné, že tyto sekvence mohou být
15 použity v polynukleotidech obecně, včetně ribopolynukleotidů.

Polypeptidy

V jednom provedení předkládaného vynálezu se poskytují polypeptidy *Neisseria meningitidis* označované zde jako „BASB029“ a
20 „polypeptidy BASB029“ stejně jako jejich biologicky, diagnosticky, profylakticky, klinicky nebo terapeuticky použitelné varianty a prostředky s obsahem těchto látek.

Předkládaný vynález dále poskytuje:

(a) izolovaný polypeptid obsahující aminokyselinovou sekvenci, která má alespoň 85% identitu, výhodněji alespoň 90% identitu, ještě
25 výhodněji alespoň 95% identitu, nejvýhodněji přibližně 97 až 99% nebo přesnou identitu, se sekvencí SEQ ID No.: 2, 4;

(b) polypeptid kódovaný izolovaným polynukleotidem obsahujícím polynukleotidovou sekvenci, který má alespoň 85%
30 identitu, výhodněji alespoň 90% identitu, ještě výhodněji alespoň 95%

identitu, nejvýhodněji přibližně 97 až 99% nebo přesnou identitu, se sekvencí SEQ ID No.: 1, 3 v průběhu celé délky SEQ ID No.: 1, 3; nebo

(c) polypeptid kódovaný izolovaným polynukleotidem
5 obsahujícím polynukleotidovou sekvenci, která kóduje polypeptid, který má alespoň 85% identitu, výhodněji alespoň 90% identitu, ještě výhodněji alespoň 95% identitu, nejvýhodněji přibližně 97 až 99% nebo přesnou identitu, se sekvencí aminokyselin SEQ ID No.: 2, 4.

Polypeptidy BASB029 poskytované v SEQ ID No.: 2, 4 jsou
10 polypeptidy BASB029 z *Neisseria meningitidis*, kmenů ATCC 13090 a H44/76.

Vynález také poskytuje imunogenní fragment polypeptidu BASB029, tj. sousedící části polypeptidu BASB029, který má stejnou nebo v podstatě stejnou imunogenní aktivitu jako polypeptid obsahující
15 aminokyselinovou sekvenci SEQ ID No.: 2, 4. Tzn., že fragment (v případě potřeby navázaný na nosič) je schopen zvýšit imunitní odezvu, která rozpozná polypeptid BASB029. Takový imunogenní fragment může například zahrnovat polypeptid BASB029 s chybějící N-koncovou úvodní sekvencí a/nebo transmembránovou doménou
20 a/nebo C-koncovou ukotvovací doménou. Ve výhodném provedení obsahuje imunogenní fragment BASB029 podle vynálezu v podstatě veškerou extracelulární doménu polypeptidu, který má alespoň 85% identitu, výhodněji alespoň 90% identitu, ještě výhodněji alespoň 95% identitu, nejvýhodněji přibližně alespoň 97 až 99% identitu, vzhledem k
25 SEQ ID No.: 2, 4 po celé délce SEQ ID No.: 2.

Fragmentem je polypeptid s aminokyselinovou sekvencí, která je zcela stejná jako část, ale ne veškerá jakákoli aminokyselinová sekvence nebo jakýkoli polypeptid podle vynálezu. Stejně jako u polypeptidů BASB029, fragmenty mohou být „samostatné“, nebo
30 mohou být obsaženy uvnitř většího polypeptidu, ze kterého tvoří část

nebo oblast, nejvýhodněji jedinou spojitou oblast v jediném větším polypeptidu.

Mezi výhodné fragmenty patří například zkrácené polypeptidy obsahující část aminokyselinové sekvence SEQ ID No.: 2, 4 nebo
5 jejich variant, jako je spojitá řada zbytků, které obsahují amino- a/nebo karboxykoncové sekvence aminokyselin. Výhodné jsou také degradační formy polypeptidů podle vynálezu, které jsou produkovány hostitelskou buňkou nebo v hostitelské buňce. Výhodné jsou dále fragmenty charakterizované strukturními nebo funkčními znaky, jako
10 fragmenty obsahující alfa-helix a oblasti vytvářející alfa-helix, beta-list a oblasti vytvářející beta-list, otočení a oblasti vytvářející otočení, svinutí a oblasti vytvářející svinutí, hydrofilní oblasti, hydrofobní oblasti, alfa-amfipatické oblasti, beta-amfipatické oblasti, pružné oblasti, oblasti tvořící povrch, oblasti vázající se na substrát a oblasti
15 s vysokým indexem antigenicity.

Další výhodné fragmenty zahrnují izolovaný polypeptid zahrnující aminokyselinovou sekvenci obsahující alespoň 15, 20, 30, 40, 50 nebo 100 sousedících aminokyselin z aminokyselinové sekvence SEQ ID No.: 2, 4, nebo izolovaný polypeptid obsahující
20 aminokyselinovou sekvenci zahrnující alespoň 15, 20, 30, 40, 50 nebo 100 sousedících aminokyselin zkrácených nebo vypuštěných z aminokyselinové sekvence SEQ ID No.: 2, 4.

Fragmenty nebo polypeptidy podle předkládaného vynálezu mohou být použity pro výrobu odpovídajícího polypeptidu s plnou
25 délkou metodou peptidové syntézy; proto mohou být tyto fragmenty použity jako meziprodukty pro výrobu úplných polypeptidů podle předkládaného vynálezu.

Zvláště výhodné jsou varianty, ve kterých je v jakékoli kombinaci provedeno několik, 5 - 10, 1 - 5, 1 - 3, 1 - 2 nebo 1 substitucí, delecí
30 adicí aminokyselin.

Polypeptidy nebo imunogenní fragmenty podle vynálezu mohou být ve formě „zralého“ (maturního) proteinu nebo mohou být částí většího proteinu, jako je prekursor nebo fúzní protein. Často je výhodné zahrnout navíc sekvenci aminokyselin, která obsahuje
5 sekvence se sekreční funkcí nebo úvodní sekvence, prosekvence, sekvence napomáhající čištění jako je několik histidinových zbytků nebo dodatečná sekvence pro dosažení stability při výrobě rekombinantního proteinu. Navíc je také možné uvážit přidání
exogenního polypeptidu nebo lipidového zakončení nebo
10 polynukleotidových sekvencí pro zvýšení imunogenního potenciálu hotové molekuly.

V jednom provedení se vynález týká rozpustných fuzních proteinů získaných metodou genetického inženýrství, které obsahují polypeptid podle předkládaného vynálezu nebo jeho fragment a různé
15 části konstantních oblastí nebo lehkých nebo těžkých řetězců imunoglobulinů různých podtříd (IgG, IgM, IgA, IgE). Jako imunoglobulin je výhodná konstantní část těžkého řetězce lidského IgG, zejména IgG1, přičemž fúze probíhá v oblasti ohybu (hinge region). V konkrétním provedení může být část Fc jednoduše
20 odstraněna přidáním štěpicí sekvence, která může být rozštěpena faktorem srážlivosti krve Xa.

Vynález se dále týká způsobů výroby těchto fuzních proteinů metodami genetického inženýrství a jejich použití pro screening léčiv, diagnózu a terapii. Další provedení vynálezu se také týká
25 polynukleotidů kódujících tyto fuzní proteiny. Příklady technologie fuzních proteinů je možno nalézt v mezinárodních patentových přihláškách WO 94/29458 a WO 94/22914.

Proteiny mohou být chemicky konjugovány nebo exprimovány jako rekombinantní fuzní proteiny umožňující produkci vyšších
30 koncentrací v expresním systému v porovnání s nefuzovaným proteinem. Fuzní partner může napomáhat při poskytování T-

helperových epitopů (imunologický fuzní partner), s výhodou T-helperových epitopů rozpoznávaných u člověka, nebo napomáhat při expresi proteinu (zvyšování exprese) při vyšších výtěžcích, než je tomu u nativního rekombinantního proteinu. S výhodou bude fuzním
5 partnerem jak imunologický fuzní partner, tak i partner zvyšující expresi.

Mezi látky s funkcí fuzního partnera patří protein D z *Haemophilus influenzae* a nestrukturní protein z viru chřipky, NS 1 (hemagglutinin). Dalším fuzním partnerem je protein známý jako LytA.
10 S výhodou se používá C-koncová část molekuly. Protein LytA je odvozen ze *Streptococcus pneumoniae*, která syntetizuje N-acetyl-L-alaninamidázu, amidázu LytA, (kódovanou genem *lytA* gen {Gene, 43 (1986), str. 265 - 272}) tedy autolysin, který specificky degraduje některé vazby v peptidoglykanové kostře. C-koncová doména proteinu
15 LytA je odpovědná za afinitu k cholinu nebo některým cholinovým analogům jako je DEAE. Tato vlastnost byla využita pro vyvinutí expresních plasmidů *E. coli* C-LytA použitelných pro expresi fuzních proteinů. Purifikace hybridních proteinů obsahujících fragment C-LytA na svých aminových koncích byla již popsána {Biotechnology: 10, (1992) str. 795 - 798}. Je možné používat opakující část molekuly
20 LytA, která se nalézá na C-konci a začíná na azbytku 178, například zbytky 188 - 305.

Do předkládaného vynálezu také patří varianty výše uvedených polypeptidů, tj. polypeptidy, které se liší od referenčních polypeptidů konzervativními substitucemi aminokyselin, přičemž zbytek je
25 substituován jiným zbytkem s podobnými vlastnostmi. Mezi takové typické substituce patří substituce mezi Ala, Val, Leu a Ile; mezi Ser a Thr; mezi kyselými zbytky Asp a Glu; mezi Asn a Gln; a mezi bazickými zbytky Lys a Arg; nebo aromatickými zbytky Phe a Tyr.

30 Polypeptidy podle předkládaného vynálezu mohou být připraveny jakýmkoli vhodným způsobem. Mezi tyto polypeptidy patří

izolované, v přírodě se vyskytující polypeptidy, polypeptidy vyrobené rekombinantními technikami, synteticky vyrobené polypeptidy, nebo polypeptidy vyrobené kombinací těchto metod. Prostředky pro výrobu těchto polypeptidů jsou v oboru dobře známy.

- 5 Nejvýhodnější je, jestliže je polypeptid podle vynálezu odvozen z *Neisseria meningitidis*, ale s výhodou může být získán z jiných organismů stejného taxonomického rodu. Polypeptid podle vynálezu může být také například získán z organismů stejné taxonomické třídy nebo řádu.

10

Polynukleotidy

Předmětem vynálezu je poskytnutí polynukleotidů, které kódují polypeptidy BASB029, zvláště polynukleotidy, které kódují polypeptid označovaný zde jako BASB029.

- 15 Ve zvláště výhodném provedení vynálezu zahrnuje polynukleotid oblast kódující polypeptidy BASB029 obsahující sekvenci uvedenou v SEQ ID No.: 1, 3, která zahrnuje gen s úplnou délkou nebo jeho variantu.

- 20 Polynukleotidy BASB029 uvedené jako SEQ ID No.: 1,3 jsou polynukleotidy BASB029 pocházející z kmenů *Neisseria meningitidis* ATCC13090 a H44/76.

- 25 V dalším provedení vynálezu se poskytují izolované molekuly nukleových kyselin kódující a/nebo exprimující polypeptidy BASB029 a polynukleotidy, zvláště polypeptidy a polynukleotidy *Neisseria meningitidis* BASB029, včetně například neprocesovaných RNA, ribozymových RNA, mRNA, cDNA, genomových DNA, B- a Z-DNA. Další provedení vynálezu zahrnují biologicky, diagnosticky, profylakticky, klinicky nebo terapeuticky použitelné polynukleotidy a polypeptidy a jejich varianty a prostředky s jejich obsahem.

Další předmět vynálezu se týká izolovaných polynukleotidů včetně alespoň jednoho genu s úplnou délkou, který kóduje polypeptid BASB029 s dedukovanou sekvencí aminokyselin SEQ ID No.: 2, 4 a polynukleotidy s nimi úzce příbuzné a jejich varianty.

5 V dalším zvláště výhodném provedení vynálezu se poskytuje polypeptid BASB029 z *Neisseria meningitidis* zahrnující nebo sestávající ze sekvence aminokyselin SEQ ID No.: 2, 4 nebo její varianty.

S použitím zde poskytovaných informací, jako je
10 polynukleotidová sekvence uvedená v SEQ ID No.: 1, 3 může být získán standardními metodami klonování a screeningu, jako jsou metody klonování a sekvenování fragmentů chromozomální DNA z bakterie použitím buněk *Neisseria meningitidis* jako výchozího materiálu a s následným získáním klonu s úplnou délkou,
15 polynukleotid podle vynálezu kódující polypeptid BASB029. Například pro získání polynukleotidové sekvence podle vynálezu jako je polynukleotidová sekvence uvedená jako SEQ ID No.: 1, 3, se typicky testuje knihovna klonů chromozomální DNA *Neisseria meningitidis* v *E. coli* nebo jiném vhodném hostiteli pomocí radioaktivně značeného
20 oligonukleotidu, s výhodou 17-meru nebo delšího, odvozeného z částečné sekvence. Klony nesoucí DNA identickou s DNA sondy mohou být potom odlišeny použitím podmínek stringentní hybridizace. Sekvenováním jednotlivých klonů, které byly takto pomocí hybridizace identifikovány, sekvenačními primery odvozenými z původní
25 polypeptidové nebo polynukleotidové sekvence, je potom možné prodlužovat polynukleotidovou sekvenci v obou směrech pro zjištění sekvence úplného genu. Toto sekvenování se pohodlně provádí například použitím denaturované dvojřetězcové DNA vyrobené z plasmidového klonu. Vhodné techniky se popisují v publikaci
30 Maniatis, T., Fritsch, E. F. a Sambrook a další, *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL*, 2. vydání; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989) (viz zvláště

část Screening By Hybridization 1,90 a Sequencing Denatured Double-Stranded DNA Templates 13,70). Pro získání genu s úplnou délkou může být také provedeno přímé sekvenování genomické DNA. Pro ilustraci je možno uvést, že každý polynukleotid uvedený v SEQ ID No.: 1, 3
5 byl objeven v knihovně DNA odvozené z *Neisseria meningitidis*.

Každá sekvence DNA uvedená v SEQ ID No.: 1, 3 navíc obsahuje otevřený čtecí rámec kódující protein s přibližně stejným počtem aminokyselinových zbytků, jako se uvádí v SEQ ID No.: 2, 4 s dedukovanou molekulovou hmotností, kterou je možno vypočíst
10 pomocí hodnot molekulových hmotností aminokyselinových zbytků, které jsou dobře známé odborníkům v oboru.

Polynukleotid sekvence SEQ ID No.: 1 kóduje mezi start kodonem na nukleotidu číslo 1 a stop kodonem, který začíná na nukleotidu číslo 1783 SEQ ID No.: 1, polypeptid SEQ ID No.: 2.

15 Polynukleotid SEQ ID No.: 3 mezi start kodonem na nukleotidu číslo 1 a stop kodonem, který začíná na nukleotidu 1774 SEQ ID No.: 3, kóduje polypeptid SEQ ID No.: 4.

V dalším provedení poskytuje předkládaný vynález izolovaný polynukleotid, který obsahuje nebo který se skládá z:

20 (a) polynukleotidové sekvence, která má alespoň 85% identitu, výhodněji alespoň 90% identitu, ještě výhodněji alespoň 95% identitu, nejvýhodněji alespoň 97 až 99% nebo přesnou identitu, se SEQ ID No.: 1, 3 podél celé délky SEQ ID No.: 1, 3; nebo

(b) polynukleotidové sekvence kódující polypeptid, který má
25 alespoň 85% identitu, výhodněji alespoň 90% identitu, ještě výhodněji alespoň 95% identitu, ještě výhodněji alespoň 97 až 99% nebo 100% přesnou identitu, se sekvencí aminokyselin SEQ ID No.: 2, 4 podél celé délky SEQ ID No.: 2, 4.

Polynukleotid kódující polypeptid podle předkládaného vynálezu
30 včetně homologů a orthologů z druhů jiných než je *Neisseria*

meningitidis, mohou být získány způsobem zahrnujícím kroky screeningu vhodné knihovny za podmínek stringentní hybridizace (například s použitím teploty v rozmezí 45 až 65 °C a při koncentraci SDS od 0,1 do 1 %) se značenou nebo detekovatelnou sondou, která
5 je složená nebo která obsahuje sekvenci SEQ ID No.: 1, 3 nebo její část; a izolací úplného genu a/nebo genomických klonů obsahujících uvedenou polynukleotidovou sekvenci.

Vynález poskytuje polynukleotidovou sekvenci, která je identická po celé své délce s kódující sekvencí (otevřený čtecí rámec) v SEQ ID
10 No.: 1, 3. Vynález také poskytuje kódující sekvenci pro zralý polypeptid nebo jeho fragment samu o sobě stejně jako kódující sekvenci pro zralý polypeptid nebo fragment uvnitř čtecího rámce s jinou kódující sekvencí, jako je sekvence kódující úvodní nebo sekreční sekvenci, pre-, nebo pro- nebo preproproteinovou sekvenci.
15 Polynukleotid podle vynálezu může také obsahovat alespoň jednu nekódující sekvenci, včetně například bez omezení alespoň jedné nekódující sekvence na 5' a 3' konci, jako jsou přepisované, ale nepřekládané sekvence, terminační signály (jako jsou rho-dependentní a rho-independentní terminační signály), vazebná místa ribozomů,
20 Kozakovy sekvence, sekvence stabilizující mRNA, introny a polyadenylační signály.

Polynukleotidová sekvence může také obsahovat další kódující sekvenci, která kóduje další aminokyseliny. Například může být zakódována markerová sekvence, která umožňuje purifikaci
25 fuzovaného polypeptidu. V některých provedeních vynálezu je markerovou sekvencí hexahistidinový peptid, jak jej poskytuje vektor pQE (Qiagen, Inc.), a který se popisuje v publikacích Gentz a další, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 86: 821 - 824 (1989), nebo značku (tag) HA peptidu (Wilson a další, Cell 37: 767 (1984), které mohou být oba
30 použity při čištění s nimi fuzované polypeptidové sekvence. Polynukleotidy podle vynálezu také bez omezení zahrnují

polynukleotidy obsahující strukturní gen a s ním přirozeně asociované sekvence, které řídí genovou expresi.

Nukleotidová sekvence kódující polypeptid BASB029 SEQ ID No.: 2, 4 může být identická s polypeptidovou kódující sekvencí
5 obsaženou v nukleotidech 1 až 1782 SEQ ID No.: 1, nebo sekvencí kódující polypeptid obsaženou v nukleotidech 1 až 1773 SEQ ID No.: 3. Alternativně může jít o sekvenci, která je důsledkem redundance (degenerace) genetického kódu, a která také kóduje polypeptid SEQ ID No.: 2, 4.

10 Termín „polynukleotid kódující polypeptid“, jak se zde používá, zahrnuje polynukleotidy, které obsahují sekvenci kódující polypeptid podle vynálezu, zvláště bakteriální polypeptid a konkrétněji polypeptid *Neisseria meningitidis* BASB029 s aminokyselinovou sekvencí uvedenou v SEQ ID No.: 2, 4. Tento termín také zahrnuje
15 polynukleotidy, které obsahují jedinou spojitou oblast nebo nespojitě oblasti kódující polypeptid (například polynukleotidy přerušené integrovaným fágem, integrovanou vloženou sekvencí, integrovanou vektorovou sekvencí, integrovanou transpozonovou sekvencí, nebo nespojitou v důsledku editace RNA nebo reorganizace genomové
20 DNA) spolu s dalšími oblastmi, které mohou rovněž obsahovat kódující a/nebo nekódující sekvence.

Vynález se dále týká variant polynukleotidů popisovaných v přihlášce, které kódují varianty polypeptidu s dedukovanou aminokyselinovou sekvencí SEQ ID No.: 2, 4.

25 Fragmenty polynukleotidů podle vynálezu mohou být například použity pro syntézu úplných (full-length) polynukleotidů podle vynálezu.

Další zvláště výhodná provedení jsou polynukleotidy kódující varianty BASB029, které mají aminokyselinovou sekvenci polypeptidu
30 BASB029 SEQ ID No.: 2, 4, ve které jsou několik, malý počet, 5 až 10, 1 až 5, 1 až 3, 2, 1 nebo žádný zbytek aminokyseliny nahrazeny,

modifikovány, vypuštěny a/nebo přidány, přičemž možná je jakákoli kombinace. Mezi těmito případy jsou zvláště výhodné tzv. mlčící (silent) substituce, adice nebo delece, které nemění vlastnosti a účinky polypeptidu BASB029.

5 Další výhodná provedení podle vynálezu jsou polynukleotidy, které mají alespoň 85% identitu po celé jejich délce s polynukleotidem kódujícím polypeptid BASB029 s aminokyselinovou sekvencí uvedenou v SEQ ID No.: 2, 4, a polynukleotidy, které jsou s těmito uvedenými polynukleotidy komplementární. V této souvislosti jsou
10 zvláště výhodné polynukleotidy s alespoň 90% identitou po celé jejich délce se stejným výše uvedeným polynukleotidem, a mezi nimi jsou zvláště výhodné polynukleotidy, které mají identitu alespoň 95 %. Navíc jsou v této skupině polynukleotidů s identitou 95 % vysoce výhodné polynukleotidy s identitou alespoň 97 % a mezi těmito jsou
15 zvláště vysoce výhodné polynukleotidy s identitou alespoň 98 % a alespoň 99 %, přičemž ještě výhodnější je identita 99 %.

Mezi výhodná provedení patří polynukleotidy kódující polypeptidy, které si zachovávají v podstatě stejnou biologickou funkci nebo aktivitu jako zralý polypeptid kódovaný DNA SEQ ID No.: 1, 3.

20 Podle jednoho z výhodných provedení vynálezu se poskytují polynukleotidy, které hybridizují, zvláště za stringentních podmínek, s polynukleotidovými sekvencemi BASB029, jako jsou polynukleotidy v SEQ ID No.: 1, 3.

Vynález se dále týká polynukleotidů, které hybridizují se zde
25 poskytovanými polynukleotidovými sekvencemi. V tomto ohledu se vynález týká zvláště polynukleotidů, které hybridizují s popisovanými polynukleotidy za stringentních podmínek. Jak se zde používá, termíny „stringentní podmínky“ a „stringentní podmínky hybridizace“ znamenají hybridizaci, ke které dojde pouze v případě, jestliže je mezi
30 sekvencemi shoda alespoň 95 % a s výhodou alespoň 97 %. Konkrétním příkladem podmínek stringentní hybridizace je inkubace

přes noc při teplotě 42 °C v roztoku obsahujícím 50% formamid, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM citran trojsodný), 50mM fosforečnan sodný (pH 7,6), 5 x Denhardtův roztok, 10% sulfát dextranu a 20 µg/ml denaturované DNA lososího spermatu upravené působením
5 střížných sil, a s následným promýváním hybridizačního nosiče v pufru 0,1 x SSC při přibližně 65 °C. Podmínky hybridizace a praní jsou dobře známé a jejich příklady se uvádějí v publikaci Sambrook, a další, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. druhé vydání, Cold Spring Harbor, N. Y, (1989), zvláště v kapitole 11. U polynukleotidových
10 sekvencí podle předkládaného vynálezu může být také použita hybridizace v roztoku.

Vynález také poskytuje polynukleotid složený z nebo obsahující polynukleotidovou sekvenci získanou screeningem vhodné knihovny obsahující úplný gen pro polynukleotidovou sekvenci uvedenou v SEQ
15 ID No.: 1, 3 za stringentních podmínek hybridizace pomocí sondy, která má sekvenci této polynukleotidové sekvence uvedené v SEQ ID No.: 1, 3 nebo její fragment; a izolací této polynukleotidové sekvence. Mezi fragmenty použitelné pro získání takového polynukleotidu patří například sondy a primery, které se zde popisují na jiných místech.

20 Jak bude diskutováno na jiných místech například ve vztahu k testování polynukleotidů podle vynálezu, tyto polynukleotidy mohou být použity jako hybridizační sonda pro RNA, cDNA a genomovou DNA pro izolaci cDNA s úplnými délkami a genomických klonů kódujících BASB029 a pro izolaci cDNA a genomických klonů jiných genů, které
25 mají vysokou identitu, zvláště vysokou sekvenční identitu, s genem BASB029. Tyto sondy budou obecně obsahovat alespoň 15 nukleotidových zbytků nebo párů bází. S výhodou budou mít tyto sondy alespoň 30 nukleotidových zbytků nebo párů bází a mohou obsahovat alespoň 50 nukleotidových zbytků nebo párů bází. Zvláště
30 výhodné sondy budou obsahovat alespoň 20 nukleotidových zbytků nebo párů bází a budou zároveň obsahovat méně než 30 nukleotidových zbytků nebo párů bází.

Kódující oblast genu BASB029 může být izolována screeningem použitím sekvence DNA poskytované v SEQ ID No.: 1, 3 pro syntézu oligonukleotidové sondy. Značený oligonukleotid se sekvencí komplementární k sekvenci genu podle vynálezu se potom použije pro screening knihovny cDNA, genomické DNA nebo mRNA pro zjištění, které molekuly z knihovny s touto sondou hybridizují.

V současnosti je k dispozici několik způsobů pro získání molekul DNA s plnou délkou nebo pro prodlužování krátkých úseků DNA, které jsou známy odborníkům v oboru, například způsoby založené na metodě Rapid Amplification of cDNA ends (RACE) (viz například Frohman, a další, *PNAS USA* 85: 8998 - 9002, 1988). Nedávné modifikace této techniky, které se například nazývají Marathon™ technology (Clontech Laboratories Inc.), podstatně zjednodušily hledání delších molekul cDNA. V technologii Marathon™ byly připraveny cDNA z mRNA extrahované ze zvolené tkáně a „adaptorové“ sekvence navázané na oba konce. Potom se provádí amplifikace nukleové kyseliny (PCR) pro namnožení „chybějícího“ 5'-konce DNA s použitím kombinace oligonukleotidových primerů specifických pro gen a pro adaptor. Reakce PCR se potom opakuje s použitím „nested“ primerů, tj. primerů navržených tak, aby teplotně hybridizovaly s amplifikovaným produktem (typicky primer specifický pro adaptor, který teplotně hybridizuje dále od 3'-konce adaptorové sekvence a primer specifický pro gen, který teplotně hybridizuje od 5'-konce zvolené genové sekvence). Produkty této reakce mohou být potom analyzovány sekvenováním DNA a úplná DNA může být zkonstruována buď navázáním produktu přímo na existující DNA za získání úplné sekvence nebo provedením oddělené PCR s plnou délkou s použitím nové informace o sekvenci pro návrh primeru 5'.

Polynukleotidy a polypeptidy podle vynálezu mohou být použity například jako reakční činidla pro výzkum a materiály pro výzkum léčení a diagnózy onemocnění, zvláště onemocnění člověka, jak bude dále diskutováno v souvislosti s analýzami polynukleotidů.

Polynukleotidy podle vynálezu, které jsou oligonukleotidy odvozené se sekvence SEQ ID No.: 1 - 4, mohou být použity u zde popisovaných způsobů, ale s výhodou pro PCR, pro zjištění, zda jsou nebo nejsou zde identifikované polynukleotidy v bakterii nebo infikované tkáni zcela nebo zčásti transkribovány. Tyto sekvence budou také použitelné při diagnóza stadia infekce a typu infekce vyvolané patogenem.

Vynález také poskytuje polynukleotidy, které kódují polypeptid, který je zralým proteinem, plus další amino- nebo karboxykoncové aminokyseliny, nebo aminokyseliny uvnitř zralého polypeptidu (jestliže například zralá forma obsahuje více než jeden polypeptidový řetězec). Tyto sekvence mohou mít mj. úlohu při úpravě (procesování) proteinu z formy prekurzoru do formy zralého proteinu, mohou umožňovat transport proteinu, mohou prodlužovat nebo zkracovat poločas proteinu nebo mohou umožňovat manipulaci s proteinem pro testování nebo výrobu. Jak je tomu obecně in vivo, další aminokyseliny mohou být procesovány mimo zralý protein celulárními enzymy.

Pro každý polynukleotid podle vynálezu se poskytuje polynukleotid, který je s ním komplementární. Je výhodné, jestliže jsou tyto komplementární polynukleotidy úplně komplementární ke každému polynukleotidu, se kterým jsou komplementární.

Prekurzorový protein, který obsahuje zralou formu polypeptidu fuzovanou k jedné nebo více prosekvencím může být inaktivní forma polypeptidu. Když se prosekvence odstraní, tyto inaktivní prekurzory se obecně aktivují. Některé nebo všechny prosekvence mohou být před aktivací odstraněny. Obecně se takové prekurzory nazývají proproteiny.

Navíc ke standardním označením nukleotidů A, G, C, T/U může být pro popis určitých polynukleotidů podle vynálezu použito označení „N“. „N“ znamená, že na takto označené poloze v sekvenci DNA nebo RNA se může objevit jakýkoli ze čtyř nukleotidů DNA nebo RNA, avšak

je výhodné, jestliže N není nukleová kyselina, která by poskytla, pokud se provádí čtení ve správném čtecím rámci a pokud se N bere v kombinaci se sousedícími kombinacemi nukleotidů, kodon předčasné trminace takového čtecího rámce.

5 Je tedy možné shrnout, že polynukleotid podle vynálezu může kódovat zralý protein, zralý protein plus úvodní sekvenci (který může být označován jako preprotein), prekursor zralého proteinu obsahující jednu nebo více prosekvencí, které nejsou úvodními sekvencemi preproteinu, nebo preproprotein, který je prekursor proproteinu, a který
10 obsahuje úvodní sekvenci a jednu nebo více prosekvencí, které se obecně v průběhu kroku procesování odstraní za vytvoření aktivní a zralé formy polypeptidu.

Podle jednoho provedení vynálezu se poskytuje použití polynukleotidu podle vynálezu pro terapeutické nebo profylaktické
15 použití, zvláště genetickou imunizaci.

Použití polynukleotidu podle předkládaného vynálezu při genetické imunizaci bude obvykle využívat vhodné metody dodávání, jako je přímá injekce plasmidové DNA do svalů (Wolff a další, *Hum. Mol. Genet.* (1992) 1: 363. Manthorpe a další, *Hum. Gene Ther.* (1983)
20 4: 419), dodání DNA v komplexu se specifickými proteinovými nosiči (Wu a další, *J. Biol. Chem.* (1989) 264: 16985), koprecipitace DNA s fosforečnanem vápenatým (Benvenisty & Reshef, *PNAS USA*, (1986) 83: 9551), zapouzdření DNA v různých formách liposomů (Kaneda a další, *Science* (1989) 243: 375), bombardování částicemi (Tang a další, *Nature* (1992) 356: 152, Eisenbraun a další, *DNA Cell. Biol.*
25 (1993) 12: 791) a infekce in vivo s využitím klonovaných retrovirálních vektorů (Seeger a další, *PNAS USA* (1984) 81: 5849).

Vektory, hostitelské buňky, expresní systémy

Vynález se také týká vektorů obsahujících polynukleotid nebo polynukleotidy podle vynálezu, hostitelských buněk, které jsou vytvořeny metodou genetického inženýrství vektory podle vynálezu a
5 výroby polypeptidů podle vynálezu rekombinantními technikami. Pro výrobu takových proteinů mohou být také použity bezbuněčné translační systémy použitím kyselin RNA odvozených z konstruktů DNA podle vynálezu.

Rekombinantní polypeptidy podle předkládaného vynálezu
10 mohou být vyrobeny způsoby dobře známými odborníkům v oboru z hostitelských buněk připravených genetickým inženýrstvím a obsahujících expresní systémy. V dalším provedení se tedy předkládaný vynález týká expresních systémů, které obsahují polynukleotid nebo polynukleotidy podle předkládaného vynálezu,
15 hostitelských buněk, které byly získány metodami genetického inženýrství s použitím těchto expresních systémů a výroby polypeptidů podle vynálezu rekombinantními technikami.

Pro rekombinantní výrobu polypeptidů podle vynálezu mohou být hostitelské buňky upraveny metodami genetického inženýrství tak, aby
20 obsahovaly expresní systémy nebo jejich části nebo polynukleotidy podle vynálezu. Zavedení polynukleotidu do hostitelské buňky může být uskutečněno způsoby popsány v mnoha standardních laboratorních manuálech, jako je Davis, a další, *BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, (1986) a Sambrook, a další, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2. vyd., Cold Spring Harbor
25 Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989), jako je například transfekce použitím fosforečnanu vápenatého, transfekce zprostředkovaná DEAE dextranem, transvekce, mikroinjekce, transfekce zprostředkovaná kationtovým lipidem, elektroporace,
30 transdukce, vnášení škrabáním, balistické vnášení a infekce.

Reprezentativními příklady vhodných hostitelů jsou například bakteriální buňky, jako jsou buňky streptokoků, stafylokoků, enterokoků, *E. coli*, streptomycet, kyanobakterií, *Bacillus subtilis*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* a *Neisseria meningitidis*; buňky hub, jako jsou kvasinkové buňky, *Kluveromyces*, *Saccharomyces*, a basidiomycety, *Candida albicans* a *Aspergillus*; hmyzí buňky, jako jsou buňky *Drosophila* S2 a *Spodoptera* Sf9; živočišné buňky jako jsou buňky CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, 293, CV-1 a buňky Bowesova melanomu; rostlinné buňky, jako jsou buňky gymnospermu nebo angiospermu.

Pro výrobu polypeptidů podle vynálezu může být použita celá řada expresních systémů. Mezi takové vektory patří mj. vektory odvozené z chromozomů, epizomů a virů, například vektory odvozené z bakteriálních plasmidů, bakteriofágů, transpozonů, kvasinkových epizomů, inzerčních elementů, kvasinkových chromozomálních elementů, virů jako jsou bakuloviry, papovaviry, jako je SV40, vakcinie, adenoviry, viry drůbežích neštovic, viry pseudorabies, pikornaviry, retroviry a alfaviry a vektory odvozené z jejich kombinací, jako jsou vektory odvozené z plasmidových a bakteriofágových genetických elementů, jako jsou kosmidy a fágmidy. Konstrukty expresních systémů mohou obsahovat řídicí oblasti, které regulují a připravují expresi. V tomto smyslu může být pro expresi obecně použit jakýkoli systém nebo vektor vhodný pro udržování, propagaci nebo expresi polynukleotidů a/nebo pro expresi polypeptidu v hostiteli. Do expresního systému může být vložena příslušná sekvence DNA jakoukoli z řady známých a rutinních technik, jako jsou například postupy uváděné v knize Sambrook a další, *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL* (výše).

U rekombinantních expresních systémů v eukaryotických organismech mohou být zavedeny do exprimovaného polypeptidu vhodné sekreční signály pro umožnění sekrece překládaného proteinu do lumen endoplazmatického retikula, do periplazmatického prostoru

nebo do extracelulárního prostředí. Tyto signály mohou být ve vztahu k polypeptidu endogenní nebo může jít o heterologní signály.

Polypeptidy podle předkládaného vynálezu mohou být izolovány a čištěny z rekombinantních buněčných kultur známými způsoby, včetně srážení síranem amonným nebo ethanolem, extrakce kyselinami, aniontovou nebo kationtovou iontoměničovou chromatografií, fosfocelulózovou chromatografií, chromatografií využívající hydrofobní interakce, afinitní chromatografií, hydroxylapatitovou chromatografií a lecitinovou chromatografií. Nejvýhodněji se pro čištění používá afinitní chromatografie s ionty kovů (ion metal affinity chromatography, IMAC). Pro regeneraci aktivní konformace proteinů v případě denaturace polypeptidu během intracelulární syntézy, izolace a/nebo purifikace mohou být použity dobře známé techniky refoldingu.

Jako expresní systém může být také použit rekombinantní živý organismus, jako je virus nebo bakterie. Příslušný gen může být vložen do genomu živé rekombinantní bakterie nebo viru. Inokulace a infekce in vivo tímto živým vektorem povede k expresi antigenu in vivo a indukci imunitních odpovědí. Viry a bakterie používané k tomuto účelu jsou například viry neštovic (např. vakcinia, drůbeží neštovice, kanárčí neštovice), alfaviry (Sindbis virus, Semliki Forest Virus, Venezuelan Equine Encephalitis Virus), adenoviry, viry spojené s adenoviry, pikornaviry (poliovirus, rhinovirus), herpesviry (varicella zoster virus, atd), Listeria, Salmonella, Shigella, Neisseria, BCG. Tyto viry a bakterie mohou být virulentní nebo oslabené různými způsoby pro získání živých vakcín. Tyto živé vakciny tvoří také část vynálezu.

Diagnostické, prognostické, sérotypové a mutační testy

Tento vynález je také zaměřen na použití polynukleotidů a polypeptidů BASB029 podle vynálezu pro použití jako diagnostických reagensů. Detekce polynukleotidů a/nebo polypeptidů BASB029

v eukaryotech, zvláště savcích a zvláště u člověka poskytuje diagnostickou metodu pro diagnózu onemocnění, stadia onemocnění nebo odpovědi infekčního organismu na léčiva. Eukaryoty, zvláště savci a zvláště člověk, zvláště jedinci infikovaní nebo s podezřením na infekci organismem obsahujícím gen nebo protein BASB029, mohou být detekovány na úrovni nukleových kyselin nebo aminokyselin řadou dobře známých způsobů stejně jako použitím zde popisovaných metod.

Polypeptidy a polynukleotidy pro prognózu, diagnózu nebo jiné analýzy mohou být získány z domněle infikovaných a/nebo infikovaných tělesných materiálů jednotlivců. Polynukleotidy z jakýchkoli těchto zdrojů, zvláště DNA nebo RNA, mohou být použity přímo pro detekci nebo mohou být enzymaticky amplifikovány použitím PCR nebo jiné techniky amplifikace před analýzou. Stejnými způsoby také mohou být použity RNA, zvláště mRNA, cDNA a genomová DNA. Použitím amplifikace může být provedena analýza genotypu zvoleného polynukleotidu organismu charakterizace druhů a kmenů infekčního organismu nebo organismu přítomného v jednotlivci. Delece nebo inserce mohou být detekovány změnou velikosti amplifikovaného produktu v porovnání s genotypem referenční sekvence zvolené z příbuzného organismu, s výhodou rozdílných druhů stejného rodu nebo rozdílných kmenů stejného druhu. Bodové mutace je možno identifikovat hybridizací amplifikované DNA se značenými polynukleotidovými sekvencemi BASB029. Úplně nebo významným způsobem souhlasící sekvence mohou být odlišeny z nedostatečně nebo podstatněji odlišných duplexů štěpením DNázou nebo RNázou pro DNA, popřípadě RNA, nebo detekcí rozdílů v teplotách tání nebo renaturačních kinetikách. Rozdíly v polynukleotidové sekvenci mohou být také detekovány změnami v elektroforetické pohyblivosti polynukleotidových fragmentů v gelech ve srovnání s referenční sekvencí. Toto porovnání může být prováděno s použitím nebo bez použití denaturačních činidel. Rozdíly mezi polynukleotidy mohou být

také detekovány přímým sekvenováním DNA nebo RNA, viz například Myers a další, *Science*, 230: 1242 (1985). Změny sekvence v určitých specifických polohách mohou být také odhaleny testy s nukleázovým chráněním, jako jsou testy s RNázovou, V1 a S1 ochranou nebo
5 metody chemického štěpení, viz například Cotton a další, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 85: 4397 - 4401 (1985).

V dalším provedení je možno vytvořit soubor oligonukleotidových sond obsahující nukleotidovou sekvenci BASB029 nebo její fragmenty, pro provádění účinného screeningu například genetických mutací, sérotypu, taxonomické klasifikace nebo identifikace. Metody
10 technologie souborů (array technology) jsou dobře známé a jsou obecně použitelné a mohou být použity vyřešení řady otázek v molekulární genetice včetně genové exprese, genetického propojování a genetické variability (viz například Chee a další,
15 *Science*, 274: 610 (1996)).

V dalším provedení se tedy předkládaný vynález týká diagnostického kitu, který zahrnuje:

- (a) polynukleotid podle předkládaného vynálezu, s výhodou s nukleotidovou sekvencí SEQ ID No. 1, 3, nebo její fragment;
- 20 (b) nukleotidovou sekvenci komplementární se sekvencí podle odstavce (a);
- (c) polypeptid podle předkládaného vynálezu, s výhodou polypeptid SEQ ID No.: 2, 4 nebo jeho fragment; nebo
- (d) protilátku proti polypeptidu podle předkládaného vynálezu,
25 s výhodou proti polypeptidu SEQ ID No.: 2, 4.

Bude zřejmé, že každý takový kit (a), (b), (c) nebo (d) může obsahovat podstatnou složku. Kit tohoto typu bude mj. použitelný při diagnostice onemocnění nebo vnímavosti na onemocnění.

Předkládaný vynález se týká také použití polynukleotidů podle
30 předkládaného vynálezu jako diagnostických činidel. Detekce

mutované formy polynukleotidu podle vynálezu, s výhodou SEQ ID No.: 1, 3, která je asociovaná s onemocněním nebo patogenitou, bude poskytovat diagnostický nástroj, který může přispět k vyřešení nebo definovat diagnózu onemocnění, prognózu průběhu onemocnění, 5 určení stadia onemocnění, nebo zjištění vnímavosti na onemocnění, které je důsledkem nedostatečné exprese, nadměrné exprese nebo změněné exprese polynukleotidu. Organismy, zvláště infekční organismy nesoucí mutace v takovém polynukleotidu mohou být detekovány na polynukleotidové úrovni řadou způsobů, jako jsou 10 způsoby popisované v předkládané přihlášce na jiných místech.

Buňky z organismu nesoucí mutace nebo polymorfismy (alelické variace) v polynukleotidu a/nebo polypeptidu podle vynálezu mohou být detekovány na úrovni polynukleotidů nebo polypeptidů řadou způsobů, což například umožní zařazení podle sérotypů. Pro detekci 15 mutací v RNA je například možno použít RT-PCR. Zvláště výhodné je použití metody RT-PCR spolu s automatickými detekčními systémy, jako je například GeneScan. Pro stejný účel PCR mohou být také použity RNA, cDNA nebo genomická DNA. Jako příklad je možno uvést použití primerů PCR komplementárních k polynukleotidu 20 kódujícímu polypeptid BASB029 pro identifikace a analýzu mutací.

Vynález dále poskytuje primery, u nichž byly odstraněny 1, 2, 3 nebo 4 nukleotidy z 5' a/nebo 3' konce. Tyto primery mohou být použity mj. pro amplifikaci BASB029 DNA a/nebo RNA izolovaných ze vzorku odvozeného z jednotlivce, jako například tělesného materiálu. 25 Tyto primery mohou být použity pro amplifikaci polynukleotidu izolovaného z infikovaného jednotlivce tak, že tento polynukleotid může být potom testován různými způsoby s cílem zjistit sekvenci polynukleotidu. Tímto způsobem je možno detekovat mutace v sekvenci polynukleotidu a výsledky použít pro diagnózu a/nebo 30 prognózu infekce nebo jejího stadia nebo průběhu, nebo pro zjištění sérotypu a/nebo klasifikaci infekčního činidla.

Předkládaný vynález dále zahrnuje způsob diagnostiky onemocnění, s výhodou bakteriálních infekcí, ještě výhodněji infekcí způsobených *Neisseria meningitidis*, který zahrnuje zjištění zvýšené míry exprese polynukleotidu se sekvencí SEQ ID No.: 1, 3 ve vzorku odebraného z jednotlivce, jako je tělesný materiál. Zvýšenou nebo sníženou expresi polynukleotidu BASB029 je možno měřit použitím jakékoli z metod známých v oboru zaměřených na kvantitativní stanovení polynukleotidů, jako je například amplifikace, PCR, RT-PCR, RNázová ochrana, northernový přenos, spektrometrie a jiné metody hybridizace.

Navíc je možno použít diagnostického testu podle vynálezu pro detekci nadměrné exprese polypeptidu BASB029 v porovnání se vzorky normální kontrolní tkáně například pro detekci přítomnosti infekce. Metody testu budou způsoby používané pro stanovení hladin polypeptidu BASB029 ve vzorku odebraném hostiteli, jako je tělesný materiál, přičemž tyto způsoby jsou v oboru dobře známé. Mezi tyto testovací metody patří radioimunologické analýzy, testy využívající kompetitivní vazby, analýza Westernovým přenosem, sendvičové protilátkové analýzy, detekce protilátek a metody ELISA.

Polynukleotidy podle vynálezu mohou být použity jako složky polynukleotidových polí, s výhodou polí nebo mříží s vysokou hustotou. Tato pole s vysokou hustotou jsou zvláště použitelná pro diagnostické a prognostické účely. Například pro zjištění přítomnosti určité polynukleotidové sekvence nebo příbuzné sekvence u jednotlivce je možno použít souboru bodově nanesených materiálů (spots), přičemž každý člen souboru obsahuje různý gen, a dále obsahuje polynukleotid nebo polynukleotidy podle vynálezu, a testování pomocí sondy, například získané hybridizací nebo amplifikací nukleové kyseliny získané z tělesného vzorku. Taková přítomnost může indikovat přítomnost patogenu, zvláště *Neisseria meningitidis*, a může být použitelná při diagnóze a/nebo prognóze onemocnění nebo průběhu onemocnění. Výhodné jsou mříže

obsahující řadu variant polynukleotidové sekvence SEQ ID No.: 1, 3. Výhodná je také mříž obsahující řadu variant polynukleotidové sekvence kódující polypeptidovou sekvenci SEQ ID No.: 2,4.

5 Protilátky

Polypeptidy a polynukleotidy podle vynálezu nebo jejich varianty nebo buňky exprimující tyto látky mohou být použity jako imunogeny pro vytvoření protilátek, které jsou imunospecifické pro tyto polypeptid, popřípadě polynukleotidy.

10 V některých výhodných provedeních podle vynálezu se poskytují protilátky proti polypeptidům nebo polynukleotidům BASB029.

Protilátky vytvořené proti polypeptidům nebo polynukleotidům podle vynálezu mohou být získány podáváním polypeptidů a/nebo polynukleotidů podle vynálezu, nebo fragmentů nesoucích epitopy
15 jedné nebo obou těchto skupin, analogů jedné nebo obou těchto skupin nebo buněk exprimujících zástupce jedné nebo obou skupin zvířeti, s výhodou zvířeti odlišnému od člověka, použitím rutinních protokolů. Pro výrobu monoklonálních protilátek je možno použít jakékoli techniky známé v oboru, která poskytuje protilátky
20 produkované kontinuálními buněčnými kulturami. Mezi příklady patří různé techniky, například popisované v Kohler, G. a Milstein, C., *Nature* 256: 495 - 497 (1975); Kozbor a další, *Imunology Today* 4: 72 (1983); Col a další, str. 77 - 96 v *MONOCLONAL ANTIBODIES A CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc. (1985).

25 Způsoby produkce jednořetězcových protilátek (US patent No. 4,946,778) mohou být upraveny pro produkci jednořetězcových protilátek proti polypeptidům nebo polynukleotidům podle předkládaného vynálezu. Pro expresi humanizovaných protilátek imunospecifických vůči polypeptidům nebo polynukleotidům podle

vynálezu mohou být také použity transgenní myši nebo jiné organismy nebo živočichové, jako jsou jiní savci.

Pro volbu genů pro protilátky s vazebnými aktivitami vzhledem k polypeptidu podle vynálezu může být také použita technologie typu
5 phage display, buď ze skupiny v-genů nebo lymfocytů amplifikovaných PCR z lidí, u kterých byl proveden screening na aktivitu anti-BASB029, nebo z knihoven (McCafferty, a další (1990), *Nature*, 348, 552 - 554; Marks, a další (1992), *Biotechnology*, 10, 779 - 783). Afinita těchto
protilátek může být také zlepšena například mícháním řetězců
10 (Clackson, a další (1991), *Nature*, 352: 628).

Výše popisované protilátky mohou být použity pro izolaci nebo pro identifikaci klonů exprimujících polypeptidy nebo polynukleotidy podle vynálezu pro čištění polypeptidů nebo polynukleotidů například afinitní chromatografií.

15 Tak například protilátky proti polypeptidu BASB029 nebo polynukleotidu BASB029 mohou být použity pro léčení infekcí, zvláště bakteriálních infekcí.

Mezi varianty polypeptidů patří antigenně, epitopově nebo imunologicky ekvivalentní varianty; tyto varianty tvoří další zvláštní
20 provedení předkládaného vynálezu.

Protilátka nebo její varianta je s výhodou modifikována, aby bylo dosaženo její menší imunogenicity u jednotlivce. Jestliže je například tímto jedincem člověk, protilátka může být nejvýhodněji „humanizována“, kde oblast nebo oblasti protilátky odvozené z
25 hybridu určující komplementaritu, jsou transplantovány do lidské monoklonální protilátky, například jak se popisuje v Jones a další (1986), *Nature*, 321, 522 - 525 nebo Tempest, a další (1991), *Biotechnology*, 9, 266 - 273.

Látky s antagonistickým a agonistickým účinkem, testy a molekuly

Polypeptidy a polynukleotidy podle vynálezu mohou být také použity pro testování vazby substrátů a ligandů s malou velikostí molekuly, například v buňkách, bezbuněčných preparátech, chemických knihovnách a směsích přírodních produktů. Tyto substráty a ligandy mohou být přírodní substráty a ligandy, nebo mohou napodobovat strukturu nebo funkci těchto látek, viz např. Coligan, a další, *Current Protocols in Immunology* (2): kapitola 5 (1991).

Metody screeningu mohou jednoduše měřit vazbu sloučeniny připadající v úvahu na polypeptid nebo polynukleotid, nebo na buňky nebo membrány nesoucí polypeptid nebo polynukleotid, nebo fuzní protein polypeptidu prostřednictvím značky, která je přímo nebo nepřímo spojená se sloučeninou připadající v úvahu. Alternativně může metoda screeningu zahrnovat kompetitivní reakci se značeným kompetitorem. Navíc mohou tyto metody screeningu testovat, zda sloučenina připadající v úvahu poskytuje signál vytvořený aktivací nebo inhibicí polypeptidu nebo polynukleotidu, s použitím detekčních systémů vhodných pro buňky obsahující polypeptid nebo polynukleotid. Inhibitory aktivace se obecně testují v přítomnosti známého agonisty a pozoruje se vliv na aktivaci agonisty přítomností sloučeniny připadající v úvahu. Při metodách screeningu na inverzní agonisty nebo inhibitory mohou být použity konstitutivně aktivní polypeptidy a/nebo konstitutivně exprimované polypeptidy a polynukleotidy, v nepřítomnosti agonisty nebo inhibitoru, testováním, zda sloučenina přicházející v úvahu poskytne inhibici nebo aktivaci polypeptidu nebo polynukleotidu. Metody screeningu mohou dále jednoduše zahrnovat kroky míchání sloučeniny připadající v úvahu s roztokem obsahujícím polypeptid nebo polynukleotid podle předkládaného vynálezu za vytvoření směsi, měření aktivity polypeptidu a/nebo polynukleotidu BASB029 ve směsi a porovnání aktivity polypeptidu a/nebo polynukleotidu BASB029 ve směsi se standardem. Pro vysoce výkonné metody screeningu pro identifikaci

antagonistů polypeptidu podle předkládaného vynálezu stejně jako fylogeneticky a/nebo funkčně příbuzných peptidů je možno také použít fuzních proteinů, jako jsou proteiny vyrobené z části Fc a polypeptidu BASB029, jak bylo popsáno výše (viz D. Bennett, a další, *J. Mol. Recognition*, 8: 52 - 58 (1995); a K. Johanson, a další, *J. Biol. Chem.*, 270 (16): 9459 - 9471 (1995)).

Polynukleotidy, polypeptidy a protilátky, které se vážou a/nebo interagují s polypeptidem podle předkládaného vynálezu, mohou být také použity pro konfiguraci metod screeningu pro detekci vlivu přidaných sloučenin na produkci mRNA a/nebo polypeptidu v buňkách. Například metoda ELISA může být upravena pro měření sekrenovaných hladin polypeptidu nebo s buňkami asociovaných hladin polypeptidu použitím monoklonálních a polyklonálních protilátek standardními metodami známými v oboru. Tak je možno zjistit látky, které mohou inhibovat nebo zvyšovat produkci polypeptidu (nazývané také látky s antagonistickým, popřípadě agonistickým účinkem) z vhodně manipulovaných buněk nebo tkání.

Vynález také poskytuje způsob screeningu sloučenin pro identifikaci těch látek, které zvyšují (agonizují) nebo blokují (antagonizují) působení polypeptidů nebo polynukleotidů BASB029, zvláště těch sloučenin, které mají bakteristické a/nebo baktericidní účinky. Mezi způsoby screeningu mohou patřit techniky s vysokou průchodností. Například pro screening látek s agonistickými nebo antagonistickými účinky se inkubuje syntetická reakční směs, buněčný kompartment jako je membrána, buněčný obal nebo buněčná stěna, nebo preparát vytvořený z těchto prvků s obsahem polypeptidu BASB029 spolu se značeným substrátem a/nebo ligandem takového polypeptidu v nepřítomnosti nebo v přítomnosti molekuly přicházející v úvahu, která může mít vzhledem k BASB029 agonistické nebo antagonistické účinky. Schopnost molekuly přicházející v úvahu agonizovat nebo antagonizovat polypeptid BASB029 se odráží ve snížené vazbě značeného ligandu nebo snížené tvorbě produktu

z takového substrátu. Molekuly, které se vážou bez následků, tj. bez indukce účinků polypeptidu BASB029, jsou nejpravděpodobněji dobrými antagonisty. Molekuly, které se dobře vážou a v závislosti na jednotlivých případech zvyšují míru tvorby produktu ze substrátu, zvyšují přenos signálu nebo zvyšují aktivitu chemického kanálu, mají agonistické účinky. Detekce míry nebo koncentrace v závislosti na jednotlivých případech, vytváření produktu ze substrátu, převodu signálů nebo aktivity chemického kanálu může být zesílena použitím reporterového systému. Reporterové systémy, které mohou být v této souvislosti užitečné, zahrnují, bez omezení na kolorimetrické metody, značený substrát převedený na produkt, reporterový gen odpovědný za změny v aktivitě polynukleotidu nebo polypeptidu BASB029 a metody testování vazby známé v oboru.

Dalším příkladem testu na látky s agonistickým účinkem na BASB029 je kompetitivní test, který kombinuje BASB029 a látku s potenciálním agonistickým účinkem s molekulami, které se vážou na BASB029, molekulami, které se vážou na rekombinantní BASB029, přirozenými substráty nebo ligandy nebo látkami napodobujícími substrát nebo ligand, za vhodných podmínek pro test kompetitivní inhibice. BASB029 může být značený, například radioaktivitou nebo sloučeninou umožňující kolorimetrické stanovení, takže lze určit počet molekul BASB029 navázaných na vazebnou molekulu nebo přeměněných na produkt a tak přesně stanovit účinnost látky s potenciálním antagonistickým účinkem.

Mezi látky s potenciálním antagonistickým účinkem patří mj. malé organické molekuly, peptidy, polypeptidy a antibiotika, která se vážou na polynukleotid a/nebo polypeptid podle vynálezu a tím inhibují nebo oslabují jeho aktivitu nebo expresi. Látkami s potenciálním antagonistickým účinkem mohou být také malé organické molekuly, peptid, polypeptid jako je úzce příbuzný protein nebo protilátka, která se váže na stejná místa na vazebné molekule, jako je vazebná molekula, aniž by indukovala účinky vyvolávané BASB029, čímž

zabrání působení nebo expresi polypeptidů a/nebo polynukleotidů BASB029 tím, že se znemožní vazba těchto polypeptidů a/nebo polynukleotidů BASB029.

Mezi látky s potenciálním antagonistickým účinkem patří malá
5 molekula, která se váže na vazebné místo pro polypeptid a obsadí je, čímž se zamezí vazbě celulárních vazebných molekul, takže se zabrání normální biologické aktivitě. Příklady malých molekul zahrnují bez omezení malé organické molekuly, peptidy nebo molekuly podobné peptidům. Mezi další látky s potenciálním antagonistickým
10 účinkem patří antisense molekuly (viz Okano, *J. Neurochem.*, 56: 560 (1991); *OLIGODEOXYNUKLEOTIDES AS ANTISENSE INHIBITORS OF GENE EXPRESSION*, CRC Press, Boca Raton, FL (1988), kde je uveden popis těchto molekul). Mezi výhodné potenciálně antagonistické sloučeniny patří látky, které jsou příbuzné s BASB029
15 nebo jsou jeho varianty.

V dalším provedení se předkládaný vynález týká rozpustných fuzních proteinů získaných genetickým inženýrstvím, které obsahují polypeptid podle předkládaného vynálezu nebo jeho fragment a různé části konstantních oblastí těžkých nebo lehkých řetězců
20 imunoglobulinů různých podtříd (IgG, IgM, IgA, IgE). Jako imunoglobulin je výhodná konstantní část těžkého řetězce lidského IgG, zvláště IgG1, kde fúze probíhá oblasti ohybu. V konkrétním provedení může být část Fc odstraněna jednoduše inkorporací štěpicí sekvence, která může být rozštěpena faktorem krevní srážlivosti Xa.
25 Předkládaný vynález se dále týká způsobů výroby těchto fuzních proteinů metodami genetického inženýrství a jejich použití pro screening léčiv, diagnózu a terapii. Další provedení vynálezu se také týká polynukleotidů kódujících tyto fuzní proteiny. Příklady technologie fuzních proteinů je možno nalézt v mezinárodních patentových
30 přihláškách No. WO 94/29458 a WO 94/22914.

Každá z polynukleotidových sekvencí poskytovaná v předkládaném vynálezu může být použita pro výzkum a vývoj antibakteriálních sloučenin. Kódovaný protein může být po expresi použit jako cíl pro screening antibakteriálních léčiv. Navíc mohou být
5 polynukleotidové sekvence kódující aminokoncové oblasti kódovaného proteinu nebo Shine-Delgarnovu sekvenci nebo jiné sekvence umožňující translaci příslušné mRNA použity pro zkonstruování antisense sekvencí pro řízení exprese kódující sekvence, o kterou se zajímáme.

10 Vynález také poskytuje použití polypeptidu, polynukleotidu, agonisty nebo antagonisty podle vynálezu pro zasahování do počáteční fyzikální interakce mezi patogenem nebo patogeny a eukaryotickým, s výhodou savčím hostitelem, odpovědnými za následnou infekci. Konkrétně mohou být použity molekuly podle
15 vynálezu: při prevenci adheze bakterií, zvláště grampozitivních a/nebo gramnegativních bakterií, na eukaryotické, s výhodou savčí proteiny extracelulární matrix nebo zařízení zasahujících do organismu nebo na proteiny extracelulární matrix v poraněních; pro blokování bakteriální adheze mezi proteiny eukaryotické, s výhodou savčí extracelulární
20 matrix a bakteriálními proteiny BASB029, které zprostředkují poškození tkáně a/nebo pro blokování normálního postupu patogeneze pro infekci iniciované jinak než implantací zařízení do organismu nebo jinými chirurgickými technikami.

Podle dalšího provedení vynálezu se poskytují látky
25 s agonistickým a antagonistickým účinkem na BASB029, s výhodou látky s agonistickým a antagonistickým účinkem s bakteristatickým nebo baktericidním působením.

Látky s antagonistickými a agonistickými účinky podle vynálezu mohou být použity například pro prevenci, inhibici a/nebo léčení
30 onemocnění.

V dalším provedení se předkládaný vynález týká mimotopů polypeptidu podle vynálezu. Mimotop je peptidová sekvence, která je dostatečně podobná nativnímu peptidu (sekvencí nebo strukturou), takže je schopná rozpoznání protilátkami, které rozpoznávají nativní peptid; nebo je schopná vyvolat tvorbu protilátek, které rozpoznávají nativní peptid při navázání na vhodný nosič.

Peptidové mimotopy mohou být navrženy pro konkrétní účel adicí, delecí nebo substitucí zvolených aminokyselin. Peptidy mohou být tedy modifikovány pro účely usnadnění konjugace na proteinový nosič. Například u některých metod chemické konjugace může být žádoucí vložení koncového cysteinu. V případě peptidů konjugovaných k proteinovému nosiči může být vhodné zavést hydrofobní zakončení na vzdáleném konci od konjugovaného zakončení peptidu, takže nekonjugovaný konec peptidu zůstává spojen s povrchem nosného proteinu. Tím je umožněno prezentování peptidu v konformaci, která nejlépe napodobuje konformaci peptidu, která se vyskytuje v případě úplné nativní molekuly. Například peptidy mohou být pozměněny tak, aby obsahovaly N-koncový cystein a C-koncové hydrofobní amidované zakončení (tail). Alternativně je možno provést adici nebo substituci D-stereoizomerní formy jedné nebo více aminokyselin za vytvoření výhodného derivátu, například umožňujícího dosažení zvýšení stability peptidu.

Alternativně mohou být peptidové mimotopy identifikovány použitím protilátek, které jsou samy schopny vázat se na polypeptidy podle předkládaného vynálezu, s použitím technik jako je technologie typu prezentace fágy (phage display technology) (EP 0 552 267 B1). Tato technika vytváří velký počet polypeptidových sekvencí, které napodobují strukturu nativních peptidů a jsou proto schopny vázat se na anti-nativní peptidové protilátky, ale nemusí nutně samy sdílet významnou sekvenční homologii s nativním polypeptidem.

Vakciny

Další provedení předkládaného vynálezu se týká způsobu indukce imunologické odpovědi u jednotlivce, zvláště savce, s výhodou člověka, který zahrnuje očkování jedince polynukleotidem a/nebo polypeptidem BASB029, nebo jeho fragmentem nebo variantou dostatečným způsobem pro vyvolání tvorby protilátek a/nebo T-buněčné odpovědi pro ochranu tohoto jedince před infekcí, zvláště bakteriální infekcí a nejlépe infekcí *Neisseria meningitidis*. Poskytují se také způsoby, při kterých tato imunologická odpověď zpomaluje replikaci bakterií. Ještě další provedení vynálezu se týká způsobu indukce imunologické odpovědi u jedince, který zahrnuje dodání vektoru nukleové kyseliny, sekvence nebo ribozymu uvedenému jedinci pro přímou expresi polynukleotidu a/nebo polypeptidu BASB029, nebo jeho fragmentu nebo varianty, pro dosažení exprese polynukleotidu a/nebo polypeptidu BASB029, nebo jeho fragmentu nebo varianty in vivo s cílem indukovat imunologickou odpověď, jako je produkce protilátky a/nebo vyvolání T-buněčné odpovědi, včetně například T-buněk produkujících cytokiny nebo cytotoxických T-buněk, pro ochranu uvedeného jednotlivce, s výhodou člověka, před onemocněním, ať už je nemoc u tohoto jedince vyvinutá nebo ne. Jedním příkladem podávání genu je jeho vpravení do požadovaných buněk ve formě povlaku na částicích nebo jinak. Takový vektor nukleové kyseliny může obsahovat DNA, RNA, a ribozym, modifikovanou nukleovou kyselinu, hybrid DNA/RNA, komplex DNA/protein nebo komplex RNA/protein.

Další provedení vynálezu se týká imunologického prostředku, který je schopný po zavedení do jednotlivce, s výhodou do člověka schopného vyvolání imunologické odpovědi, vyvolat imunologickou odpověď na polynukleotid BASB029 a/nebo jím kódovaný polypeptid, přičemž prostředek obsahuje rekombinantní polynukleotid BASB029 a/nebo jím kódovaný polypeptid a/nebo obsahuje DNA a/nebo RNA kódující a exprimující antigen uvedeného polynukleotidu BASB029, jím

kódovaného polypeptidu nebo jiného polypeptidu podle vynálezu. Imunologická odpověď může být použita terapeuticky nebo profylakticky a může mít formu protilátkové imunity a/nebo buněčné imunity, jako je buněčná imunita vyvolaná buňkami CTL nebo CD4+ T.

- 5 Polypeptid BASB029 nebo jeho fragment mohou být fuzovány s pomocným proteinem (koproteinem) nebo chemickou skupinou, které mohou nebo nemusí samy o sobě produkovat protilátky, ale které jsou schopny stabilizovat první protein a produkovat fuzovaný nebo modifikovaný protein, který bude mít antigenní a/nebo imunogenní
- 10 vlastnosti, a s výhodou ochranné vlastnosti. Fuzovaný rekombinantní protein tedy s výhodou dále obsahuje antigenní pomocný protein jako je lipoprotein D z *Haemophilus influenzae*, glutathion-S-transferázu (GST) nebo betagalaktosidázu, nebo jiný relativně velký pomocný protein, který umožňuje solubilizaci proteinu a jeho výrobu a čištění.
- 15 Navíc může pomocný protein působit jako adjuvans ve smyslu poskytnutí generalizované stimulace imunitního systému organismu, kterému byl protein podán. Pomocný protein může být navázán buď na aminový nebo karboxylový konec prvního proteinu.

- Předkládaný vynález poskytuje prostředky, zvláště vakciny,
- 20 a způsoby zahrnující polypeptidy a/nebo polynukleotidy podle vynálezu a imunostimulační sekvence DNA, jaké se poskytují v Sato, Y. a další, *Science* 273: 352 (1996).

- Vynález také poskytuje způsoby použití popisovaného polynukleotidu nebo jeho konkrétních fragmentů, u kterých bylo
- 25 zjištěno, že kódují nevariabilní oblasti povrchových proteinů bakteriálních buněk, v polynukleotidových konstruktech použitých v experimentech s genetickou imunizací na zvířecích modelech týkajících se infekce *Neisseria meningitidis*. Tyto experimenty budou zvláště užitečné pro identifikaci proteinových epitopů schopných
- 30 provokovat profylaktickou nebo terapeutickou imunitní odpověď. Předpokládá se, že tento přístup umožní následnou přípravu zvláště

cenných monoklonálních protilátek odvozených z požadovaného orgánu živočicha úspěšně odolávajícího nebo potlačujícího infekci, pro vývoj preventivních prostředků nebo způsobů léčení bakteriální infekce, zvláště infekce *Neisseria meningitidis* u savců, zvláště lidí.

5 Vynález také zahrnuje vakcínu obsahující imunogenní rekombinantní polypeptid a/nebo polynukleotid podle vynálezu spolu s vhodným nosičem, jako je farmaceuticky přijatelný nosič. Protože polypeptidy a polynukleotidy se mohou v žaludku rozkládat, podávají se s výhodou parenterálně, včetně například subkutánního, intramuskulárního, intravenózního nebo intradermálního podávání.
10 Mezi formulace vhodné pro parenterální podávání patří vodné a nevodné sterilní injekční roztoky, které mohou obsahovat antioxidanty, pufrы, bakteristatické sloučeniny a roztoky, které umožňují dosažení isotonického stavu s tělesnou tekutinou, zvláště
15 krví jednotlivce; a vodné a nevodné sterilní suspenze, které mohou obsahovat suspendující nebo zahušťující činidla. Formulace mohou být upraveny ve formě jednotkových dávek nebo zásobníků obsahujících větší počet dávek, například uzavřených ampulích a lahvičkách a mohou být uchovávány v lyofilizovaném stavu, přičemž
20 bezprostředně před použitím je nutné pouze přidat sterilní kapalný nosič.

Vakcína podle vynálezu může obsahovat adjuvantní systémy pro zvýšení imunogenicity prostředku. Adjuvantní systém s výhodou vyvolává preferenčně typ buněčné odpovědi TH1.

25 Imunitní odpověď může být rozlišena na dvě extrémní kategorie, a to humorální nebo buněčná imunitní odpověď (tradičně charakterizovaná protilátkovým, popřípadě buněčně-efektorovým mechanismem ochrany). Tyto kategorie odpovědí se označují jako odpovědi typu TH1 (odpověď zprostředkovaná buňkami) a odpověď
30 typu TH2 (humorální odpověď).

Extrémní imunitní odpovědi typu TH1 mohou být charakterizovány tvorbou antigenně specifických, haplotypově omezených cytotoxických T-lymfocytů a odpovědí přirozených buněk - zabíječů. U myši jsou odpovědi typu TH1 často charakterizovány vytvářením protilátek subtypu IgG2a, zatímco u lidí tyto odpovědi vytvářejí protilátky typu IgG1. Buněčné odpovědi typu TH2 jsou charakterizovány tvorbou širokého spektra imunoglobulinových isotypů včetně u myši IgG1, IgA, a IgM.

Je třeba vzít v úvahu, že hnací silou stojící za vytvářením těchto dvou typů imunitních odpovědí jsou cytokiny. Vysoké hladiny cytokinů typu TH1 upřednostňují indukci imunitních odpovědí na daný antigen zprostředkovaných buňkami, zatímco vysoké hladiny cytokinů typu TH2 mají sklon upřednostňovat indukci humorálních imunitních odpovědí na antigen.

Dělení imunitních odpovědí na typ TH1 a TH2 však není absolutní. Ve skutečnosti bude jedinec podporovat imunitní odpověď, která se popisuje jako převážně TH1 nebo převážně TH2. Je však často vhodné uvažovat třídy cytokinů z hlediska skupin popsanych v myších klonech CD4+ ve T buněk autory Mosmannem a Coffmanem (Mosmann, T. R. a Coffman, R. L. (1989) *TH1 a TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology*, 7, str. 45 - 173).

Tradičně jsou odpovědi typu TH1 spojeny s produkcí cytokinů INF- γ a IL-2 T-lymfocyty. Další cytokiny, často přímo spojené s indukci imunitních odpovědí typu TH1, nejsou produkovány T-buňkami (například IL-12). Naopak odpovědi typu TH2 jsou spojeny se sekrecí IL-4, IL-5, IL-6 a IL-13.

Je známo, že některá vakcinační adjuvans jsou zvláště vhodná pro stimulaci cytokinových odpovědí buď TH1 nebo TH2. Tradičně patří mezi nejlepší indikátory rovnováhy TH1 : TH2 u imunitní odpovědi po vakcinaci nebo infekci přímé měření produkce cytokinů

TH1 nebo TH2 T-lymfocyty in vitro po restimulaci antigenem, a/nebo měření poměru IgG1 : IgG2a odpovědí protilátek specifických pro určitý antigen.

Adjuvans typu TH1 je tedy adjuvans, které přednostně stimuluje
5 izolované populace T-buněk k produkci vysokých hladin cytokinů typu TH1 při restimulaci antigenem in vitro, a podporuje vytváření jak CD8+ cytotoxických T-lymfocytů, tak i imunoglobulinových odpovědí specifických pro antigen spojených s isotypem typu TH1.

Adjuvans, která jsou schopná přednostní stimulace buněčné
10 odpovědi TH1, se popisují v mezinárodních patentových přihláškách No. WO 94/00153 a WO 95/17209.

Jedním takovým adjuvans je 3-De-O-acylovaný monofosforyllipid A (3D-MPL). Ten je znám z GB 2220211 (Ribi). Chemicky jde o směs 3-De-O-acylovaného monofosforyllipidu A s 4, 5
15 nebo 6 acylovanými řetězci, která je vyráběna firmou Ribi Immunochem, Montana. Výhodná forma 3-De-O-acylovaného monofosforyllipidu A se popisuje v evropském patentu 0 689 454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA).

S výhodou jsou částice 3D-MPL dostatečně malé, aby je bylo
20 možno sterilizovat filtrací membránou 0,22 µm (evropský patent no. 0 689 454).

3D-MPL bude přítomen v množství 10 µg až 100 µg, s výhodou 25 až 50 µg na dávku, přičemž antigen bude typicky přítomen v rozmezí 2 až 50 µg na dávku.

25 Další výhodné adjuvans zahrnuje QS21, netoxická frakce vyčištěná HPLC z kůry Quillaja Saponaria Molina. Tato látka může být popřípadě smíchána s 3-De-O-acylovaným monofosforyllipidem A (3D-MPL), popřípadě spolu s nosičem.

Způsob výroby QS21 se popisuje v US patentu No. 5,057,540.

Nereaktogenní adjuvantní směsi obsahující QS21 byly popsány již dříve (WO 96/33739). Tyto formulace obsahující QS21 a cholesterol se ukázaly při společné formulaci s antigenem jako úspěšná TH1-stimulující adjuvans.

- 5 Další adjuvans, která jsou preferenčními stimulátory buněčné odpovědi TH1, zahrnují imunomodulační oligonukleotidy, například nemethylované sekvence CpG popisované ve WO 96/02555.

Jako vhodné adjuvantní látky preferenčně stimulující buněčnou odpověď TH1 je také možno uvažovat kombinace různých TH1-stimulujících adjuvans, jako jsou směsi uvedené výše. Například QS21
10 může být formulován spolu s 3D-MPL. Poměr QS21 : 3D-MPL bude typicky řádově 1 : 10 až 10 : 1; s výhodou 1 : 5 až 5 : 1 a často v podstatě 1 : 1. Výhodné rozmezí pro dosažení optimální synergie je 2,5 : 1 až 1 : 1 3D-MPL : QS21.

- 15 Ve vakcíně podle předkládaného vynálezu je také s výhodou přítomen nosič. Nosičem může být emulze typu olej ve vodě nebo hlinitá sůl, jako je fosforečnan hlinitý nebo hydroxid hlinitý.

Výhodná emulze typu voda v oleji obsahuje metabolizovatelný olej, jako je skvalen, alfa-tokoferol a Tween 80. Ve zvláště výhodném
20 provedení se antigeny ve vakcíně podle vynálezu kombinují v takovéto emulzi s QS21 a 3D-MPL. Navíc může emulze typu olej ve vodě obsahovat span 85 a/nebo lecitin a/nebo trikaprylin.

Pro podávání člověku budou QS21 a 3D-MPL typicky přítomny ve vakcíně v rozmezí 1 µg až 200 µg, jako 10 až 100 µg, s výhodou
25 10 µg až 50 µg na dávku. Emulze typu olej ve vodě bude typicky obsahovat od 2 do 10 % skvalenu, od 2 do 10 % alfatokoferolu a od 0,3 do 3 % Tweenu 80. Poměr skvalen : alfatokoferol je s výhodou rovný nebo menší než 1, protože takto vznikají stabilnější emulze. Span 85 může být také přítomen v množství 1 %. V některých
30 případech může být výhodné, aby vakcíny podle předkládaného vynálezu navíc obsahovaly stabilizátor.

Netoxické emulze typu olej ve vodě s výhodou obsahují netoxický olej, například skvalan nebo skvalen a emulgátor, například Tween 80, ve vodném nosiči. Vodný nosič může být například fyziologický roztok s fosfátovým puftrem.

- 5 Zvláště účinná adjuvantní formulace obsahuje QS21, 3D-MPL a tokoferol v emulzi typu olej ve vodě, jak se popisuje ve WO 95/17210.

Předkládaný vynález také poskytuje polyvalentní vakcínu obsahující vakcinační formulaci podle vynálezu v kombinaci s jinými antigeny, zvláště antigeny použitelnými pro léčení rakoviny,
10 autoimunitních onemocnění a s nimi souvisejících stavů. Taková polyvalentní vakcína může obsahovat adjuvans indukující TH-1 odpověď, jak bylo popsáno výše.

I když byl vynález popsán na určitých polypeptidech a polynukleotidech BASB029, je zřejmé, že pokrývá také fragmenty
15 v přírodě se vyskytujících polypeptidů a polynukleotidů, a podobné polypeptidy a polynukleotidy obsahující adice, delece nebo substituce, které podstatným způsobem neovlivní imunologické vlastnosti rekombinantních polypeptidů nebo polynukleotidů.

Antigen může být také dodáván ve formě celé bakterie (živé
20 nebo usmrcené) nebo jako subcelulární frakce, přičemž tyto možnosti zahrnují také samotnou *N. meningitidis*.

Prostředky, kity a podávání

V dalším provedení vynálezu se poskytují prostředky obsahující
25 polynukleotid BASB029 a/nebo polypeptid BASB029 pro podávání do buňky nebo do vícebuněčného organismu.

Vynález se také týká prostředků obsahujících polynukleotid a/nebo a polypeptid diskutovaný výše, nebo na ně působící agonistické nebo antagonistické látky. Polypeptidy a polynukleotidy
30 podle vynálezu mohou být použity v kombinaci s nesterilním nosičem

nebo nosiči pro použití v buňkách, tkáních nebo organismech, jako je farmaceutický nosič pro podávání jednotlivci. Tyto prostředky obsahují například aditivum do média nebo terapeuticky účinné množství polypeptidu a/nebo polynukleotidu podle vynálezu a farmaceuticky přijatelný nosič nebo pomocnou látku. Mezi tyto nosiče mohou bez omezení patřit fyziologický roztok, pufrovaný fyziologický roztok, dextróza, voda, glycerol, ethanol a jejich kombinace. Formulace by měla být přizpůsobena způsobu podávání. Předkládaný vynález se dále týká diagnostických a farmaceutických balení a kitů obsahujících jednu nebo více nádobek naplněných jednou nebo více složkami výše uvedených prostředků podle vynálezu.

Polypeptidy, polynukleotidy a jiné sloučeniny podle vynálezu mohou být používány samostatně nebo spolu s jinými látkami, jako jsou terapeutické látky.

Farmaceutické prostředky mohou být podávány jakýmkoli účinným a pohodlným způsobem, včetně například topického, orálního, análního, vaginálního, intravenózního, intraperitoneálního, intramuskulárního, subkutánního, intranazálního nebo intradermálního podání.

Při léčení nebo prevenci může být účinná látka podávána jednotlivci jako prostředek ve formě injekce, například jako sterilní vodná disperze, s výhodou isotonická.

V dalším provedení poskytuje předkládaný vynález farmaceutické prostředky obsahující terapeuticky účinné množství polypeptidu a/nebo polynukleotidu, jako je rozpustná forma polypeptidu a/nebo polynukleotidu podle předkládaného vynálezu, peptid s agonistickým nebo antagonistickým účinkem nebo sloučenina s malou molekulou, v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo pomocnou látkou. Mezi tyto nosiče patří bez omezení fyziologický roztok, pufrovaný fyziologický roztok, dextróza, voda, glycerol, ethanol a jejich kombinace. Předkládaný vynález se dále týká

farmaceutických balení a kitů obsahujících jednu nebo více nádobek naplněných jednou nebo více složkami výše uváděných prostředků podle vynálezu. Polypeptidy, polynukleotidy a jiné látky podle předkládaného vynálezu mohou být používány samostatně nebo spolu
5 s dalšími sloučeninami, jako jsou terapeutické sloučeniny.

Prostředek bude přizpůsoben způsobu podávání, například systémovému podávání nebo orálnímu podávání. Mezi výhodné formy systémového podávání patří injekce, typicky intravenózní injekce. Mohou být také použity jiné typy injekcí, jako jsou subkutánní,
10 intramuskulární nebo intraperitoneální. Mezi alternativní prostředky pro systémové podávání patří transmukosální a transdermální podávání s použitím látek napomáhajících penetraci jako jsou žlučové kyseliny nebo fusidové kyseliny nebo další detergenty. Navíc mohou být polypeptid nebo jiné sloučeniny podle předkládaného vynálezu
15 formulovány v enterosolventním nebo zapouzdřeném prostředku a je také možné orální podávání. Tyto sloučeniny mohou být také podávány místně a/nebo lokalizovaně, ve formě balzámů, past, gelů, roztoků, prášků atd.

Pro podávání savcům a zvláště člověku bude očekávaná denní
20 dávka účinné látky od 0,01 mg/kg do 10 mg/kg, typicky kolem 1 mg/kg. Lékař určí v každém případě skutečnou dávku, která bude pro jednotlivce nejvhodnější, a která se bude lišit podle věku, hmotnosti a reakce konkrétního jednotlivce. Výše uvedené dávky jsou pouze příklady pro průměrného pacienta. Mohou samozřejmě existovat
25 jednotlivé případy, kdy jsou oprávněny vyšší nebo nižší rozsahy dávek, které spadají rovněž do rozsahu vynálezu.

Požadované rozmezí dávek závisí na výběru peptidu, cestě podávání, povaze formulace, povaze nemoci a stavu jednotlivce a úsudku ošetřujícího lékaře. Vhodné dávky jsou však v rozmezí 0,1
30 až 100 µg/kg tělesné hmotnosti pacienta.

Vakcíny jsou vhodně v injekční formě. Pro zvýšení imunitní odpovědi je možno použít běžných adjuvans. Vhodná jednotková dávka pro vakcinaci je 0,5 až 5 $\mu\text{g/kg}$ antigenu, přičemž tato dávka se s výhodou podává 1 až 3 x a v intervalu jednoho až tří týdnů.

5 S uvedeným rozmezím dávek se u sloučenin podle vynálezu nepozorují nepříznivé toxikologické účinky, které by vyloučily jejich podávání vhodným jedincům.

Je možno očekávat široké variace v potřebných dávkách z hlediska různých dostupných sloučenin a rozdílných účinností různých způsobů podávání. Například se předpokládá, že u orálního podávání bude nutné podávat vyšší dávky než v případě podávání intravenózní injekcí. Variace těchto dávek mohou být upraveny podle standardních empirických metod pro optimalizaci, jak se to v oboru běžně provádí.

10

15

Databáze sekvencí, sekvence v reálném prostředí a algoritmy

Sekvence polynukleotidů a polypeptidů tvoří cenný zdroj informací, pomocí kterého lze určit dvou a třírozměrné struktury stejně jako identifikovat další sekvence s podobnou homologií. Tyto přístupy jsou nejjednodušší uskutečňovány uchováváním sekvence na počítačově čitelném médiu a potom použitím uchovaných dat ve známém programu pro výpočet makromolekulární struktury nebo pro hledání databáze sekvencí pomocí známých prohledávacích nástrojů, jako je programový balík GCG.

20

Vynález také poskytuje způsoby analýzy charakteristických sekvencí nebo řetězců, zvláště genetických sekvencí nebo kódovaných proteinových sekvencí. Mezi výhodné způsoby analýzy sekvencí patří například způsoby analýzy sekvenční homologie, jako je analýza identity a podobnosti, analýza struktury DNA, RNA a proteinů, uspořádání sekvence, analýza chránění, analýza sekvenčních motivů,

25

30 stanovení otevřeného čtecího rámce, použitíází nukleovou kyselinou,

analýza využití kodonu, snížení počtu bází nukleové kyseliny a analýza vrcholů sekvenačního chromatogramu.

Pro provádění identifikace homologie se poskytuje počítačová metoda. Tato metoda zahrnuje kroky poskytnutí první nukleotidové
5 sekvence obsahující sekvenci polynukleotidu podle vynálezu na počítačově čitelném médiu; a porovnání uvedené první nukleotidové sekvence s alespoň jednou druhou polynukleotidovou nebo polypeptidovou sekvencí pro identifikaci homologie. Počítačová metoda se také poskytuje pro provádění identifikace homologie,
10 přičemž tato metoda zahrnuje kroky poskytnutí první polypeptidové sekvence obsahující sekvenci polypeptidu podle vynálezu na počítačově čitelném médiu; a porovnání uvedené první polypeptidové sekvence s alespoň jednou druhou polynukleotidovou nebo polypeptidovou sekvencí pro identifikaci homologie.

15 Všechny publikace a odkazy, včetně bez omezení patentů a patentových přihlášek, citované v předkládané přihlášce, jsou zde zařazeny ve své úplnosti odkazem, tak jako by každá jednotlivá publikace nebo každý odkaz byly uvedeny ve svém celku. Stejným způsobem jsou zde také zařazeny jakékoli uváděné přihlášky, jejichž
20 prioritu předkládaná přihláška nárokuje.

Definice

"Identita", tak jak je známa v oboru, je vztah mezi dvěma nebo více polypeptidovými sekvencemi, nebo mezi dvěma nebo více
25 polynukleotidovými sekvencemi podle konkrétního případu, tak jak je určena porovnáním sekvencí. V oboru také „identita“ znamená stupeň příbuznosti sekvencí mezi sekvencemi polypeptidu nebo polynukleotidu podle konkrétního případu, který je určen shodou mezi řetězcí těchto sekvencí. „Identita“ může být snadno vypočtena
30 známými způsoby, včetně bez omezení způsobů popsanych v *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M, ed., Oxford University

Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W, ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, Část I, Griffin, A. M, a Griffin, H. G, ed., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heine, G., Academic Press, 1987; a *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. a Devereux, J., ed., M. Stockton Press, New York, 1991; a Carillo, H., a Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988). Metody pro určování identity jsou navrženy tak, aby poskytly co nejvyšší shodu mezi testovanými sekvencemi. Navíc jsou metody pro určení identity zakódovány ve veřejně dostupných počítačových programech. Jako počítačové programy pro určení identity mezi dvěma sekvencemi je možno uvést program GAP, který je součástí programového balíku GCG (Devereux, J., a další, *Nucleic Acids Research* 12(1): 387 (1984)), BLASTP. BLASTN (Altschul, S. F., a další, *J. Molec. Biol.* 215: 403 - 410 (1990), a FASTA (Pearson a Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444 - 2448 (1988)). Skupina programů BLAST je dostupná veřejnosti u NCBI i z jiných zdrojů (BLAST *Manual*, Altschul, S., a další, NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., a další, *J. Mol. Biol.* 215: 403 - 410 (1990)). Pro stanovení identity může být také použit dobře známý Smith Watermanův algoritmus.

Mezi parametry zadávané pro porovnání polypeptidové sekvence patří následující:

Algoritmus: Needleman a Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 - 453 (1970)
Comparison matrix: BLOSSUM62 from Henikoff a Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 10915 - 10919 (1992)

Gap Penalty: 8

Gap Length Penalty: 2

Program použitelný s těmito parametry je dostupný jako program "gap" u firmy Genetics Computer Group, Madison WI. Výše uvedené

parametry jsou parametry, které jsou nastaveny jako výchozí (spolu s parametrem „no penalty“ pro koncové mezery).

Parametry pro porovnání polynukleotidů jsou například následující:

5

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

Comparison matrix: matches = +10, mismatch = 0

Gap Penalty: 50

Gap Length Penalty: 3

10

Dostupný jako: program "gap" firmy Genetics Computer Group, Madison WI. Uváděné parametry jsou nastaveny pro srovnávání nukleových kyselin jako výchozí.

Výhodný význam výrazu „identita“ pro polynukleotidy a polypeptidy podle konkrétního případu se poskytuje v následujících částech (1) a (2) níže.

15

(1) Provedení polynukleotidů dále zahrnují izolovaný polynukleotid obsahující polynukleotidovou sekvenci, která má alespoň 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 nebo 100% identitu s referenční sekvencí SEQ ID No.: 1, přičemž uvedená polynukleotidová sekvence může být s referenční sekvencí SEQ ID No.: 1 identická, nebo může obsahovat až do určitého celého čísla změny nukleotidů ve srovnání s referenční sekvencí, přičemž tyto změny (alterace) jsou zvoleny ze skupiny zahrnující alespoň jednu deleci, substituci, včetně tranzice a transverze nebo inserce nukleotidu, a kde uvedené změny se mohou vyskytovat v 5' nebo 3' koncových polohách referenční nukleotidové sekvence, nebo na kterémkoli místě mezi těmito terminálními polohami, a mohou být rozprostřeny buď jednotlivě mezi nukleotidy referenční sekvence nebo v jedné nebo více sousedících skupin uvnitř referenční sekvence a kde uvedený počet nukleotidových změn stanovený vynásobením celkového množství nukleotidů v SEQ ID No.: 1 celým číslem definujícím procento identity, vydělením 100 a

20

25

30

odečtením výsledku z uvedeného celkového počtu nukleotidů v SEQ ID No.: 1, nebo:

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

kde n_n je počet nukleotidových změn, x_n je celkový počet nukleotidů v SEQ ID No.: 1, y je 0,50 pro 50 %, 0,60 pro 60 %, 0,70 pro 70 %, 0,80 pro 80 %, 0,85 pro 85 %, 0,90 pro 90 %, 0,95 pro 95 %, 0,97 pro 97 % nebo 1,00 pro 100 %, a $\cdot$ je symbol operátoru násobení, a kde jakýkoli neceločíselný výsledek pro x_n a y je zaokrouhlen dolů na nejbližší celé číslo před odečtením od x_n . Alterace polynukleotidové sekvence kódující polypeptid SEQ ID No.: 2 mohou vytvářet v této kódující sekvenci mutace typu nonsense, missense nebo frameshift a tím měnit polypeptid kódovaný polynukleotidem po těchto změnách.

Například polynukleotidová sekvence podle předkládaného vynálezu může být identická s referenční sekvencí SEQ ID No.: 1, tj. může mít 100% identitu, nebo může obsahovat až do určitého celočíselného počtu změn nukleových kyselin ve srovnání s referenční sekvencí, takže procentní identita je menší než 100 %. Tyto změny se volí ze skupiny delece, substituce, včetně tranzice a transverze, nebo inserce alespoň jedné nukleové kyseliny, přičemž uvedené změny se mohou vyskytovat v 5' nebo 3' koncových polohách referenční polynukleotidové sekvence nebo kdekoli mezi těmito koncovými polohami, rozprostřené buď jednotlivě mezi nukleovými kyselinami v referenční sekvenci nebo v jedné nebo více sousedících skupinách uvnitř referenční sekvence. Počet změn nukleových kyselin pro danou identitu v procentech je určen vynásobením celkového počtu nukleových kyselin v SEQ ID No.: 1 celým číslem definujícím procentní identitu dělenou 100 a odečtením výsledku od celkového počtu nukleových kyselin v SEQ ID No.: 1, neboli:

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

kde n_n je počet změn nukleových kyselin, x_n je celkový počet nukleových kyselin v SEQ ID No.: 1, y je například 0,70 pro 70 %, 0,80 pro 80 %, 0,85 pro 85 % atd., $\bullet$ je symbol operátoru násobení, a jakýkoli neceločíselný výsledek pro x_n a y se zaokrouhlí dolů na
 5 nejbližší celé číslo před odečtením od x_n .

(2) Provedení polypeptidů dále zahrnují izolovaný polypeptid obsahující polypeptid s alespoň 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 nebo 100% identitou vzhledem k referenční polypeptidové sekvenci SEQ ID No.: 2, kde polypeptidová sekvence může být identická s referenční
 10 sekvencí SEQ ID No.: 2 nebo může obsahovat až do určitého celočíselného počtu změn aminokyselin v porovnání s referenční sekvencí, přičemž uvedené změny jsou zvoleny ze skupiny delece, substituce, včetně konzervativní a nekonzervativní substituce nebo
 15 inzerce alespoň jedné aminokyseliny, a kde uvedené změny se mohou vyskytovat na amino nebo karboxykoncových polohách referenční polypeptidové sekvence nebo kdekoli mezi těmito koncovými polohami, rozprostřené buď jednotlivě mezi aminokyselinami referenční sekvence nebo v jedné nebo více sousedících skupinách uvnitř referenční sekvence, a kde uvedený počet změn nukleových
 20 kyselin se určí vynásobením celkového počtu aminokyselin v SEQ ID No.: 2 celým číslem definujícím procentní identitu dělenou 100 a odečtením výsledku od uvedeného celkového počtu aminokyselin v SEQ ID No.: 2, neboli:

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

25 kde n_a je počet změn aminokyselin, x_a je celkový počet aminokyselin v SEQ ID No.: 2, y je 0,50 pro 50 %, 0,60 pro 60 %, 0,70 pro 70 %, 0,80 pro 80 %, 0,85 pro 85 %, 0,90 pro 90 %, 0,95 pro 95 %, 0,97 pro 97 % nebo 1,00 pro 100 %, a $\bullet$ je symbol operátoru násobení, a kde jakýkoli neceločíselný produkt x_a a y je zaokrouhlen
 30 dolů na nejbližší celé číslo před odečtením od x_a .

Polypeptidová sekvence podle předkládaného vynálezu může být identická s referenční sekvencí SEQ ID No.: 2, takže může být stoprocentně identická, nebo může obsahovat až do určitého celočíselného počtu změn aminokyselin v porovnání s referenční sekvencí, takže procentní identita je menší než 100 %. Tyto změny jsou zvoleny ze skupiny delece, substituce, včetně konzervativní a nekonzervativní substituce nebo inserce alespoň jedné aminokyseliny, a kde uvedené změny se mohou vyskytovat v amino nebo karboxykoncových polohách referenční polypeptidové sekvence nebo kdekoli mezi těmito koncovými polohami, rozprostřeny buď jednotlivě mezi aminokyselinami referenční sekvence nebo v jedné nebo více sousedících skupinách uvnitř referenční sekvence. Počet změn aminokyselin pro danou procentní identitu se určí vynásobením celkového počtu aminokyselin v SEQ ID No.: 2 celým číslem definujícím procentní identitu vyděleným 100 a odečtením výsledku od uvedeného celkového počtu aminokyselin v SEQ ID No.: 2, neboli:

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

kde n_a je počet změn aminokyselin, x_a je celkový počet aminokyselin v SEQ ID No.: 2, y je například 70 pro 70 %, 0,80 pro 80 %, 0,85 pro 85 % atd., a $\bullet$ je symbol operátoru násobení, a kde neceločíselný výsledek x_a a y je zaokrouhlen dolů na nejbližší celé číslo před odečtením x_a .

„Jednotlivec“ nebo „jednotlivci“ označují organismus, tzn. vícebuněčný organismus včetně savce, ptáka, opice, primáta a člověka.

„Izolovaný“ znamená změněný „rukou člověka“ proti přirozenému stavu, tj. pokud se objekt vyskytuje v přírodě, byl změněn nebo vyjmut z původního prostředí nebo obojí. Například polynukleotid nebo polypeptid přítomný přirozeně v živém organismu není „izolovaný“, ale stejný polynukleotid nebo polypeptid oddělený od koexistujících materiálů přírodního stavu je „izolovaný“ ve smyslu použití tohoto

termínu v předkládané přihlášce. Navíc je polynukleotid nebo polypeptid, který je zavedený do organismu transformací, genovou manipulací nebo jakoukoli jinou rekombinantní metodou je „izolovaný“, i když je ještě přítomen v uvedeném organismu, přičemž tento
5 organismus může být živý nebo neživý.

„Polynukleotid“ nebo „polynukleotidy“ obecně označují jakýkoli polyribonukleotid nebo polydeoxyribonukleotid, kterými mohou být nemodifikovaná RNA nebo DNA nebo modifikovaná RNA nebo DNA včetně jednořetězcových a dvouřetězcových oblastí.

10 Termín „varianta“ označuje polynukleotid nebo polypeptid, který se liší od referenčního polynukleotidu nebo polypeptidu, ale zachovává si nezbytné vlastnosti. Typická varianta polynukleotidu má odlišnou nukleotidovou sekvenci od dalšího, referenčního polynukleotidu. Změny v nukleotidové sekvenci varianty mohou nebo nemusí změnit
15 aminokyselinovou sekvenci polypeptidu kódovaného referenčním polynukleotidem. Změny nukleotidů mohou vést k substitucím, adicím, delecím, fúzím aminokyselin a zkrácením polypeptidu kódovaného referenční sekvencí, jak je diskutováno níže. Typická varianta polypeptidu se liší v aminokyselinové sekvenci od jiného, referenčního
20 polypeptidu. Obecně jsou rozdíly omezeny na rozdíly sekvencí varianty vzhledem k referenčnímu polypeptidu, které poskytují celkově úzce podobné sekvence a v mnoha oblastech identické. Varianta a referenční polypeptid se mohou odlišovat v aminokyselinové sekvenci jednou nebo více substitucemi, adicemi nebo delecemi v jakékoli
25 kombinaci. Substituované nebo vložené aminokyselinové zbytky buď mohou být nebo nemusí být kódovány genetickým kódem. Varianta polynukleotidu nebo polypeptidu se může vyskytovat v přírodě, jako například alelická varianta, nebo může jít o variantu, o které není známo, že by se v přírodě vyskytovala. Varianty polynukleotidů a
30 polypeptidů, které se v přírodě nevyskytují, mohou být vyrobeny technikami mutagenese nebo přímou syntézou.

„Onemocnění“ znamená jakoukoli nemoc nebo nemoci způsobené nebo související s infekcí způsobenou bakterií, včetně například infekce horního dýchacího traktu a invazivních bakteriálních onemocnění jako je bakteremie a meningitida.

5

Příklady provedení vynálezu

Příklady uváděné dále se provádějí standardními technikami, které jsou v oboru dobře známé kromě výjimek, které se podrobně popisují. Příklady jsou ilustrativní a neomezují vynález.

10

Příklad 1: Sekvenování DNA genu BASB029 ze dvou kmenů *N. meningitidis* pro účely výzkumu a potvrzení sekvence

A: BASB029 v *N. meningitidis* séro skupina B kmen ATCC13090

Gen BASB029 se sekvencí SEQ ID No.: 1 byl poprvé objeven
15 v databázi Incyte PathoSeq, obsahující neukončené genomové
sekvence DNA *N. meningitidis*, kmen ATCC 13090. Translace
polynukleotidové sekvence BASB029 ukázané v SEQ ID No.: 2, měla
významnou podobnost (52 % identita v 582 překrývajících se
aminokyselinách) s povrchovým fibrilárním (HSF) proteinem
20 *Haemophilus influenzae*.

Sekvence genu BASB029 byla dále experimentálně potvrzena.
K tomu účelu byla extrahována genomická DNA z 10^{10} buněk *N.*
meningitidis (kmen ATCC 13090) s použitím extrakčního kitu pro
genomickou DNA QIAGEN firmy Qiagen GmbH, a 1 µg tohoto
25 materiálu byl amplifikován polymerázovou řetězovou reakcí použitím
primeru Hsf1 (5'-GGG GCA TAT GAA CAA AAT ATA CCG CAT CAT
TTG GAA-3') [SEQ ID No.: 5] obsahujícího vnitřní místo *NdeI*
(podtrženo) a primeru Hsf2 (5'-GGG GCT CGA GCC ACT GAT AAC
CGA CAG ATG CGG A-3') [SEQ ID No.: 6] obsahujícího vnitřní místo

XhoI (podtrženo). Tento produkt PCR byl čištěn na gelu a bylo provedeno sekvenování DNA použitím sekvenačního kitu Big Dye Cycle Sequencing kit (Perkin-Elmer) a sekvenátoru DNA ABI 373A/PRISM. Sekvenování DNA bylo prováděno na obou řetězcích s dvojnásobnou redundancí a úplná sekvence byla uspořádána použitím programu SeqMan ze softwarového balíku DNASTAR Lasergene. Získaná sekvence DNA ukázala 100% identitu se SEQ ID No.: 1.

10 B: BASB029 v *N. meningitidis* séro skupiny B kmen H44/76

Sekvence kmenu BASB029 byla také zjišťována v další bakterii *N. meningitidis* séro skupiny B, kmen H44/76. Pro tento účel byla extrahována genomická DNA z *N. meningitidis*, kmen H44/76 použitím stejných experimentálních podmínek, jako v příkladu 1. Tento materiál (1 µg) byl potom amplifikován PCR s použitím primerů Hsf1 a Hsf2 specifických pro gen BASB029. Byl získán fragment DNA o délce 4389bp, který byl štěpen restričními endonukleázami *NdeI/XhoI* a vložen do odpovídajících míst klonovacího/expresního vektoru pET-24b (Novagen) použitím standardních technik molekulární biologie (Molecular Cloning, a Laboratory Manual, druhé vydání, ed: Sambrook, Fritsch & Maniatis, Cold Spring Harbor press 1989). Rekombinantní vektor pET-24b/BASB029 byl potom sekvenován pomocí kitu Big Dyes (Applied Biosystems) a analyzován na sekvenátoru DNA ABI 373/A za podmínek předepsaných dodavatelem. Takto byl získán polynukleotid a dedukované polypeptidové sekvence označené jako SEQ ID No.: 3, popř. SEQ ID No.: 4. Použitím programu PILEUP z balíku GCG bylo provedeno porovnání polynukleotidových sekvencí SEQ ID No.: 1 a 3, přičemž výsledky jsou uvedeny na obr. 1; míra identity zjištěná programem GAP byla 96,8 %. Použitím stejného programu PILEUP bylo provedeno srovnání polypeptidových sekvencí SEQ ID No.: 2 a 4, které je uvedeno na obr.

2; stupeň identity zjištěný programem GAP byl 94,2 %. Souhrnně je možno říci, že tyto údaje ukazují na silnou konzervaci sekvence genu BASB029 mezi dvěma kmeny *N. meningitidis* séro skupiny B.

5 Příklad 2: Exprese a purifikace rekombinantního proteinu BASB029 v *Escherichia coli*

Konstrukce klonovacího/expresního vektoru pET-24b/BASB029 byla popsána v příkladu 1B. Tento vektor nese gen BASB029 izolovaný z kmene H44/76 fúzovaný s řadou šesti histidinových zbytků, a je umístěn pod řízením silného promotoru genu 10 bakteriofága T7. Pro studium exprese byl tento vektor zaveden do kmene *Escherichia coli* Novablue (DE3) (Novagen), ve kterém byl gen pro T7 polymerázu umístěn pod kontrolu regulovatelného *lac* promotoru isopropyl-beta-D-thiogalaktosidázy (IPTG). Kapalně kultury (100 ml) rekombinantního kmene Novablue (DE3) [pET24b/BASB029] *E. coli* byly ponechány růst při 37 °C za míchání až do dosažení optické density při 600 nm (OD600) 0,6. V tomto místě byl přidán IPTG na konečnou koncentraci 1 mM a kultura byla ponechána růst 4 další hodiny. Kultura byla potom centrifugována při 10 000 ot/min a biomasa byla zmrazena při -20 °C na alespoň 10 hod. Po roztání byla biomasa resuspendována v průběhu 30 min při teplotě 25 °C v pufru A (6M guanidinhydrochlorid, 0,01M NaH₂PO₄, 0,001M Tris, pH 8,0), 3 x protlačena jehlou a zcentrifugována (20 000 ot/min, 15 min). Vzorek byl potom nanesen při plném průtoku 1 ml/min na kolonu Hitrap s naneseným Ni²⁺ (Pharmacia Biotech). Po nanesení byla kolona postupně promyta 40 ml pufru B (8M močovina, 0,01M NaH₂PO₄, 0,01M Tris, pH 8,0), 40 ml pufru C (8M močovina, 0,1M NaH₂PO₄, 0,01M Tris, pH 6,3). Rekombinantní protein BASB029/His6 byl potom z kolony eluován 30 ml pufru D (8M močovina, 0,1M NaH₂PO₄, 0,01M Tris, pH 6,3) s obsahem 500 mM imidazolu, přičemž byly jímány frakce 3 ml. Jak je ukázáno v obr. 3 (dráha 1), z kolony byl eluován vysoce obohacený

(čistota při barvení coomassie byla odhadována na více než 90%) protein BASB029/His6, který se pohyboval při molekulové hmotnosti 66 kDa (66 000) (odhadovaná relativní molekulová hmotnost). Tento polypeptid byl reaktivní proti myší monoklonální protilátce zaměřené
 5 proti 5-histidinovému motivu (viz obr. 3, dráha 2). Tato data společně ukazují, že gen BASB029 je možno exprimovat a purifikovat v rekombinantní formě (BASB029/His6) v *E. coli*.

Příklad 3: Imunizace myši rekombinantním BASB029

10 Částečně purifikovaný rekombinantní protein BASB029 exprimovaný v *E. coli* byl třikrát vstříknut myším Balb/C ve dnech 0, 14 a 29 (8 zvířat/skupina). Zvířatům byly podány subkutánní injekce obsahující přibližně 5 µg antigenu ve dvou různých formulacích. Buď adsorbovaný na 100 µg AlPO₄, nebo formulovaný v emulzi SBAS2
 15 (emulze SB62 obsahující 5 µg MPL a 5 µg QS21 na dávku). Negativní kontrolou byly myši imunizované pouze emulzí SBAS2. Vzorky krve byly odebrány ve dnech 29 (15 dnů po II) a 35 (6 dnů po III) pro detekci specifických anti-BASB029 protilátek. Specifické anti-BASB029 protilátky byly měřeny v odděleném séru (z 10 myší/skupina)
 20 metodou westernového přenosu na šesti různých kmenech NmB (obr. 4 a 5).

Rozpoznání epitopů BASB029 v různých kmenech NmB westernovým přenosem

V tomto testu byla vyšetřována séra imunizovaných myší
 25 (spojená) westernovým přenosem na rozpoznávání epitopů BASB029 šesti různých kmenů *Neisseria meningitidis* B: H44/76 (B:15:P1.7, 16, linie ET-5), M97 250987 (B:4:P1.15), BZ10 (B:2b:P1.2, linie A4), BZ198 (B:NT*: -, linie 3), EG328 (B:NT*, linie ST-18), a ATCC 13090 Men B, stejně jako částečně purifikovaného rekombinantního proteinu
 30 BASB029 (*: NT: netypováno).

Ve stručnosti je možno uvést, že 10 μ l ($>10^8$ buněk/dráha) každého vzorku po smísení se vzorkovým puftrem (10 min při 95 °C) se nanese na gradientový gel SDS-PAGE (Tris-glycin 4 až 20 %, Novex, kód No. EC60252). Elektroforetická migrace probíhala při 125 V 90 min. Potom se proteiny převádějí na nitrocelulózovou membránu (0,45 μ m, Bio-rad kód No. 162 - 0114) při 100 V 1 hod na systému Bio-rad Trans-blot system (kód No. 170 - 3930). Filtr byl blokován puftrem PBS - 0,05% Tween 20 přes noc při teplotě laboratoře, před inkubací s myším sérem obsahujícím protilátky anti-BASB029 pocházející jak z formulace AIPO₄, tak i SBAS2. Tato séra se 100 x ředí puftrem PBS - 0,05% Tween 20, a inkubují se na nitrocelulózové membráně 2 hod při teplotě laboratoře za mírného třepání na systému mini-blotter system (Miniprotean, Bio-rad kód No. 170 - 4017). Po třech opakovaných promývacích krocích v pufru PBS - 0,05% Tween 20 po dobu 5 min, se nitrocelulózová membrána inkubuje při teplotě laboratoře 1 hod za mírného třepání s příslušným konjugátem (biotinylované ovčí protilátky proti myšimu Ig, Amersham kód No. RPN1001) při ředění 1/500 ve stejném promývacím pufru. Membrána se promyje třikrát jako předtím a inkubuje se 30 min za míchání s komplexem streptavidin-peroxidáza (Amersham kód No. 1051) při ředění 1/1000 v promývacím pufru. Po posledních třech opakovaných krocích promývání probíhá vyvíjení při době inkubace 20 min v 50 ml roztoku obsahujícího 30 mg 4-chlor-1-naftolu (Sigma), 10 ml methanolu, 40 ml PBS a 30 μ l H₂O₂. Barvení se zastaví několikanásobným promytím membrány destilovanou vodou.

Výsledky na obr. 4 a 5 ukazují, že ve všech testovaných kmenech je přítomen očekávaný pruh v okolí 65 až 70 kDa (65 000 až 70 000), a dva hlavní pruhy v okolí 55 a 90 kD (55 000 a 90 000), které jasně souvisejí s tímto proteinem BASB029 (polymery, degradační produkty). To znamená, že protein BASB029 se pravděpodobně exprimuje u většiny, pokud ne u všech kmenů NmB. V obr. 4 se rekombinantní protein BASB029 objevuje ve formě čtyř

rozdílných pruhů, dvou při očekávaných molekulových hmotnostech 65 až 70 kDa (65 000 až 70 000), a dvou dalších při velmi vysokých molekulových hmotnostech (>200 kDa, 200 000), které jsou pravděpodobně agregáty rekombinantního proteinu BASB029.

5

Příklad 4: Přítomnost protilátek anti-BASB029 v sérech zotavených pacientů

Při tomto testu byla vyšetřována séra zotavených pacientů westernovým přenosem na rozpoznávání čištěného rekombinantního proteinu BASB029.

Ve stručnosti, 5 µg částečně purifikovaného proteinu BASB029 NmB se nanese na gradientový gel SDS-PAGE (4 - 20%, Novex, kód No. EC60252) a provede se elektroforetická migrace. Proteiny se převedou na nitrocelulózovou membránu (0,45 µm, Bio-rad kód No. 162-0114) při napětí 100 V po dobu 1 hod na blotovacím systému Bio-rad Trans-blot system (kód No. 170-3930). Potom se filtr blokuje pufrém PBS-0,05 % Tween 20 přes noc při teplotě laboratoře, před inkubací s lidským sérem. Tato séra se ředí stokrát pufrém PBS-0,05% Tween 20, a inkubují se na nitrocelulózové membráně 2 hod při teplotě laboratoře za mírného třepání na systému mini-blotter system (Miniprotean, Bio-rad kód No. 170-4017). Po třech opakovaných krocích promývání v pufru PBS-0,05% Tween 20 5 min, se nitrocelulózová membrána inkubuje při teplotě laboratoře 1 hod za mírného třepání s vhodným konjugátem (biotinylované ovčí protilátky proti lidskému IgG, Amersham kód No. RPN1003) při ředění 1/500 ve stejném promývacím pufru. Membrána se třikrát promyje jako předtím a inkubuje se 30 min za míchání s použitím komplexu streptavidin-peroxidáza (Amersham kód No. 1051) při ředění 1/1000 v promývacím pufru. Po posledních třech promývacích krocích se provede vyvíjení po dobu 20 min v 50 ml roztoku obsahujícího 30 mg 4-chlor-1-naftolu (Sigma), 10 ml methanolu, 40 ml ultračisté vody a 30 µl H₂O₂. Barvení

se zastaví několikanásobným promytím membrány destilovanou vodou.

Výsledky jsou ilustrovány na obr 6 a 7, které ukazují, že u všech sedmi sér rekonvalescentů došlo k reakci s rekombinantním proteinem BASB029 v okolí molekulových hmotností 65 až 70 kDa (65 000 až 70 000), přičemž u většiny se také objevují dva horní pruhy (>200 kDa, 200 000), přičemž u několika z nich se objevuje pouze slabá reakce. Reakce proti proteinům s vysokou molekulovou hmotností potvrzuje, že tyto dva pruhy jasně souvisejí s proteinem BASB029, a že jde pravděpodobně o jejich agregované formy. V části A obr. 6 a 7 jsou vidět stejné reakce proti těmto čtyřem pruhům u imunizovaného myšího séra. To jasně potvrzuje, že všechny tyto čtyři pruhy souvisejí s rekombinantním proteinem BASB029. V obr 7 jsou také ukázána negativní myší séra, která s rekombinantním proteinem nereagují.

15

Uložené materiály

Kmen *Neisseria meningitidis* séroskupina B byla uložena ve sbírce American Type Culture Collection (dále "ATCC") 22. června 1997 pod depozitním číslem 13090. Uložený mikroorganismus byl popsán jako *Neisseria meningitidis* (Albrecht a Ghon) a je lyofilizovaný a zahrnuje knihovnu insertu 1,5 až 2,9 kb zkonstruovanou z izolátu *N. meningitidis*. Toto uložení se popisuje v Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon. 8: 1 - 15 (1958).

Uložený kmen *Neisseria meningitidis* se zde označuje jako „uložený kmen“ nebo jako „DNA uloženého kmenu“.

Uložený kmen obsahuje úplný gen BASB029. Sekvence polynukleotidů obsažená v uloženém kmenu stejně jako jakákoli sekvence aminokyselin jakéhokoli polypeptidu kódovaného tímto nukleotidem je v případě jakéhokoli konfliktu týkajícího se popisu sekvenci rozhodující.

Uložení kmene bylo provedeno v souladu s Budapešťskou
dohodou o mezinárodním uznávání ukládání mikroorganismů pro účely
udělování patentů. Tento kmen bude neodvolatelně a bez omezení
nebo podmínek zpřístupněn po udělení patentu veřejnosti. Uložený
5 kmen se poskytuje pouze pro pohodlí odborníků v oboru a uložení
neznamená, že by bylo považováno za nezbytné pro jasnost a úplnost
popisu nebo jeho uskutečnění.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Izolovaný polypeptid obsahující aminokyselinovou sekvenci,
5 která má alespoň 85% identitu s aminokyselinovou sekvencí zvolenou ze skupiny SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4 po celé délce sekvencí SEQ ID No. 2, popřípadě SEQ ID No. 4.
2. Izolovaný polypeptid podle nároku 1, ve kterém má
10 aminokyselinová sekvence alespoň 95% identitu s aminokyselinovou sekvencí zvolenou ze skupiny SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4 po celé délce sekvencí SEQ ID No. 2, popřípadě SEQ ID No. 4.
3. Polypeptid podle nároku 1, který obsahuje aminokyselinovou
15 sekvenci zvolenou ze skupiny SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4.
4. Izolovaný polypeptid, který má sekvenci SEQ ID No. 2, SEQ ID
No. 4.
- 20 5. Polypeptid obsahující imunogenní fragment polypeptidu podle některého z nároků 1 až 4, přičemž tento imunogenní fragment je schopen zvýšit imunitní odpověď rozpoznávající polypeptid SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4.
- 25 6. Polypeptid podle nároku 5, kde imunogenní fragment je navázán na nosič.

- 5 7. Izolovaný polynukleotid obsahující nukleotidovou sekvenci kódující polypeptid, který má alespoň 85% identitu s aminokyselinovou sekvencí SEQ ID No. 2, 4 po celé délce SEQ ID No. 2, popřípadě 4; nebo nukleotidová sekvence s tímto izolovaným polynukleotidem komplementární.
- 10 8. Izolovaný polynukleotid obsahující nukleotidovou sekvenci, která má alespoň 85% identitu s nukleotidovou sekvencí kódující polypeptid SEQ ID No. 2, 4 po celé délce kódující oblasti, nebo nukleotidová sekvence s tímto izolovaným polynukleotidem komplementární.
- 15 9. Izolovaný polynukleotid, obsahující nukleotidovou sekvenci, která má alespoň 85% identitu se sekvencí SEQ ID No. 1, 3 po celé délce sekvencí SEQ ID No. 1, popřípadě 3; nebo nukleotidová sekvence s tímto izolovaným polynukleotidem komplementární.
- 20 10. Izolovaný polynukleotid podle některého z nároků 7 až 9, který má identitu se SEQ ID No. 1, 3 alespoň 95 %.
11. Izolovaný polynukleotid obsahující nukleotidovou sekvenci kódující polypeptid SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4.
- 25 12. Izolovaný polynukleotid obsahující polynukleotid SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3.
13. Izolovaný polynukleotid obsahující nukleotidovou sekvenci kódující polypeptid SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4 získatelný

screeningem vhodné knihovny za stringentních podmínek hybridizace pomocí značené sondy se sekvencí SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 nebo jejich fragmentu.

- 5 14. Expresní vektor nebo izolovaný živý mikroorganismus obsahující rekombinantní polynukleotid podle některého z nároků 7 až 13.
- 10 15. Hostitelská buňka obsahující expresní vektor podle nároku 14 nebo subcelulární frakci nebo membránu uvedené hostitelské buňky exprimující izolovaný polypeptid obsahující aminokyselinovou sekvenci, která má alespoň 85% identitu s aminokyselinovou sekvencí zvolenou ze skupiny SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4.
- 15 16. Způsob výroby polypeptidu obsahujícího aminokyselinovou sekvenci, která má alespoň 85% identitu s aminokyselinovou sekvencí zvolenou ze skupiny SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e zahrnuje kroky, při
- 20 kterých se kultivuje hostitelská buňka podle nároku 15 za podmínek dostatečných pro produkci uvedeného polypeptidu a polypeptid se z kultivačního média izoluje.
- 25 17. Způsob exprese polynukleotidu podle některého z nároků 7 až 14, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e zahrnuje kroky, při kterých se transformuje hostitelská buňka expresním vektorem obsahujícím alespoň jeden z uvedených polynukleotidů a uvedená hostitelská buňka se kultivuje za
- 30 podmínek dostatečných pro expresi jakéhokoli z uvedených polynukleotidů.

18. Vakcína, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e obsahuje účinné množství polypeptidu podle některého z nároků 1 až 6 a farmaceuticky přijatelný nosič.
5
19. Vakcína, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e obsahuje účinné množství polynukleotidu podle nároku 7 až 13 a farmaceuticky účinný nosič.
▪
▪
- 10 20. Vakcína podle některého z nároků 18 nebo 19, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e obsahuje alespoň jeden jiný antigen *Neisseria meningitidis*.
- 15 21. Protilátka imunospecifická pro polypeptid nebo imunologický fragment podle některého z nároků 1 až 6.
- 20 22. Způsob diagnózy infekce *Neisseria meningitidis*, který zahrnuje identifikaci polypeptidu podle některého z nároků 1 až 6, nebo protilátky, která imunospecifická je pro uvedený polypeptid přítomný v biologickém vzorku živočicha s podezřením na takovou infekci.
- 25 23. Použití prostředku obsahujícího imunologicky účinné množství polypeptidu podle některého z nároků 1 až 6 při výrobě léku pro použití při vyvolání imunitní odpovědi u živočicha.

24. Použití prostředku obsahujícího imunologicky účinné množství polynukleotidu podle některého z nároků 7 až 13 při výrobě léku pro použití při vyvolání imunitní odpovědi u živočicha.
- 5 25. Farmaceutický prostředek použitelný při léčení člověka s onemocněním vyvolaným *Neisseria meningitidis*, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e obsahuje alespoň jednu protilátku proti polypeptidu podle některého z nároků 1 až 6 a vhodný farmaceutický nosič.

10

Zastupuje:

29.01.01

1/12

PV2011-4602

7/29

Obr. 1

Porovnání polynukleotidových sekvencí BASB029.

Identita vzhledem k SEQ ID No. 1 je označena tečkou a pomlčka znamená chybějící nukleotid.

```

                20          40          60          80          100
Seqid1:ATGAACAAAATATACCGCATCATTTGGAATAGTGCCCTCAATGCCTGGGT:50
Seqid3:.....:50

                60          80          100
Seqid1:CGCCGTATCCGAGCTCACACGCAACCACACCAAACGCGCCTCCGCAACCG:100
Seqid3:.....:100

                120         140
Seqid1:TGGCGACCGCCGTATTGGCGACACTGTTGTTTGAACGGTTCAGGCGAGT:150
Seqid3:..AA.....A....:150

                160         180         200
Seqid1:ACTACCGAT-----GACGACGATTTATTTAGAACCCGTACAACG:191
Seqid3:G...A.A..GAAGAGCAA..A..A.....C.....:200

                220         240
Seqid1:CACTGCTGTCTGTGTTGAGCTTCCGTTCCGATAAAGAAGGCACGGGAGAAA:241
Seqid3:.....T..C.....TAG..AA.....:250

                260         280         300
Seqid1:AAG---AAGTTACAGAAGATTCAAATTGGGGAGTATATTTGACAAGAAA:288
Seqid3:...AAA....AGA....A.....G.....C.....A..G.....:300

                320         340
Seqid1:GGAGTACTAACAGCCGGAACAAATCACCTCAAAGCCGGCGACAACCTGAA:338
Seqid3:.....A..GA.....:350

```

290101

2/12

```

          360          *          380          *          400
Seqid1:AATCAAACAAAACACCAATGAAAACACCAATGCCAGTAGCTTCACCTACT:388
Seqid3:.....G..CA.A.....:382

          *          420          *          440          *
Seqid1:CGCTGAAAAAAGACCTCACAGATCTGACCAGTGTTGGAAGTAAAAATTA:438
Seqid3:.....:432

          460          *          480          *          500
Seqid1:TCGTTTAGCGCAAACAGCAATAAAGTCAACATCACAAGCGACACCAAAGG:488
Seqid3:.....G.....:482

          *          520          *          540          *
Seqid1:CTTGAATTCGCGAAAAAAACGGCTGAGACCAACGGCGACACCACGGTTC:538
Seqid3:.....T.....G.....G...G.....:532

          560          *          580          *          600
Seqid1:ATCTGAACGGTATCGGTTGACTTTGACCGATACGCTGCTGAATACCGGA:588
Seqid3:..C.....T.....:582

          *          620          *          640          *
Seqid1:GCGACCACAAACGTAACCAACGACAACGTTACCGATGACGAGAAAAAACG:638
Seqid3:.....:632

          660          *          680          *
Seqid1:TGCGGCAAGCGTTAAAGACGTATTAACGCAGGCTGGAACATTAAAGGCG:688
Seqid3:.....:682
```

29.01.01

3/12

720 740
Seqid1: TTAAACCCGGTACAACAGCTTCGATAACGTTGATTCGTCCGCACTTAC:738
Seqid3::732

760 780 800
Seqid1: GACACAGTCGAGTTCTTGAGCGCAGATACGAAAACAACGACTGTTAATGT:788
Seqid3::782

820 840
Seqid1: GGAAAGCAAAGACAACGGCAAGAGAACCGAAGTTAAAATCGGTGCGAAGA:838
Seqid3:A.....:832

860 880 900
Seqid1: CTTCTGTTATCAAAGAAAAAGACGGTAAGTTGGTTACTGGTAAAGACAAA:888
Seqid3:T.....:882

920 940
Seqid1: GGCGAGAATGATTCTTCTACAGACAAAGGCGAAGGCTTAGTGACTGCAAA:938
Seqid3:G.....G.....:932

960 980 1000
Seqid1: AGAAGTGATTGATGCAGTAAACAAGGCTGGTTGGAGAATGAAAACAACAA:988
Seqid::982

1020 1040
Seqid1: CCGCTAATGGTCAAACAGGTCAAGCTGACAAGTTTGAAACCGTTACATCA:1038
Seqid3::1032

1060 1080 1100
Seqid1: GGCACAAATGTAACCTTTGCTAGTGGTAAAGGTACAACGCGACTGTAAG:1088
Seqid3::1082

29.01.01

4/12

* 1120 * 1140 *

Seqid1:TAAAGATGATCAAGGCAACATCACTGTTATGTATGATGTAAATGTCGGCG:1138
Seqid3:.....:1132

1160 * 1180 * 1200

Seqid1:ATGCCCTAAACGTCAATCAGCTGCAAAACAGCCGTTGGAATTTGGATTCC:1188
Seqid3:.....:1182

* 1220 * 1240 *

Seqid1:AAAGCGGTTGCAGGTTCTTCGGGCAAAGTCATCAGCGGCAATGTTTCGCC:1238
Seqid3:.....:1232

1260 * 1280 * 1300

Seqid1:GAGCAAGGGAAAGATGGATGAAACCGTCAACATTAATGCCGGCAACAACA:1288
Seqid3:.....:1282

* 1320 * 1340 *

Seqid1:TCGAGATTACCCGCAACGGCAAAAATATCGACATCGCCACTTCGATGACC:1338
Seqid3:.....T.....:1332

1360 * 1380 * 1400

Seqid1:CCGCAATTTTCCAGCGTTTCGCTCGGCGCGGGGGCGGATGCGCCCACTTT:1388
Seqid3:.....G.....:1382

* 1420 * 1440 *

Seqid1:AAGCGTGGATGACGAGGGCGCGTTGAATGTCGGCAGCAAGGATGCCAACA:1438
Seqid3:G.....G...A...A.....A.G.A.....:1429

29.01.01

5/12

1460

1480

1500

Seqid1:AACCCGTCGCGATTACCAATGTCGCCCCGGGCGTTAAAGAGGGGGATGTT:1488

Seqid3:.....:1479

1520

1540

Seqid1:ACAAACGTGCGACAACCTAAAGGCGTGGCGCAAACTTGAACAACCAT:1538

Seqid3:.....G....:1529

1560

1580

1600

Seqid1:CGACAATGTGGACGGCAACGCGCGTGGGGCATCGCCAAGCGATTGCAA:1588

Seqid3:.....:1579

1620

1640

Seqid1:CCGCGGTCTGGTTCAGGCGTATCTGCCCCGCAAGAGTATGATGGCGATC:1638

Seqid3:.....T.....:1629

1660

1680

1700

Seqid1:GGCGGCGGCACTTATCGCGGCGAAGCCGGTTATGCCATCGGCTACTCAAG:1688

Seqid3:.....C.....C...:1679

1720

1740

Seqid1:CATTTCGACGGCGGAAATTGGATTATCAAAGGCACGGCTTCGGGCAATT:1738

Seqid3:T.....:1729

1760

1780

Seqid1:CGCGCGGCCATTTGGTGCTTCGCATCTGTCGGTTATCAGTGGTAA:1785

Seqid3:.....:1776

29.01.01

6/12

Obr. 2

Porovnání polypeptidových sekvencí BASB029.

Identita vzhledem k SEQ ID No. 2 je označena tečkou a pomlčka
znamená chybějící aminokyselinu.

```

      *           20           *           40           *
Seqid2: MNKIYRIIWNLSALNAWVAVSELTRNHTKRASATVATAVLATLLFATVQAS:50
Seqid4: .....K.....:50

      60           *           80           *           100
Seqid2: T-- -TDDDDLYLEPVQRTAVVLSFRSDKEGTGEKE-VTEDSNWGVYFDKK:96
Seqid4: ANNEEQEE ....D.....VA..IVN.....K.E.....A....E.:100

      *           120           *           140           *
Seqid2: GVLTAGTITLKAGDNLKIKQNTNENTNASSFTYSLKKDLTDLTSVGTEKL:146
Seqid4: .....RE.....G N.....:144

      160           *           180           *           200
Seqid2: SFSANSNKVNITSDTKGLNFAKKTAETNGDTTVHLNGIGSTLTDTLLNTG:196
Seqid4: .....G.....E..G.....:194

      *           220           *           240           *
Seqid2: ATTNVTNDNVTDDEKKRAASVKDVLNAGWNIKGVPKPGTTASDNVDFVRTY:246
Seqid4: .....:244

      260           *           280           *           300
Seqid2: DTVEFLSADTKTTTVNVESKDNGKRTEVKIGAKTSVIKEKDGLVTGKDK:296
Seqid4: .....:294

      *           320           *           340           *
Seqid2: GENDSSTDKGGLVTAKEVIDAVNKAGWRMKT TTANGQTGQADKFETVTS:346
Seqid4: ...G....E.....:344

```

29.01.01

7/12

360 * 380 * 400
Seqid2:GTNVTFASGKGTATVSKDDQGNITYMYDVNVGDALNVNQLQNSGWNLDS:396
Seqid4:.....:394

* 420 * 440 *
Seqid2:KAVAGSSGKVISGNVSPSKGKMDETVNINAGNNIEITRNGKNIDIATSMT:446
Seqid4:.....:444

460 * 480 * 500
Seqid2:PQFSSVSLGAGADAPTLSVDDEGALNVGSKDANKPVRITNVAPGVKEGDV:496
Seqid4:.....GD-.....KD.....:493

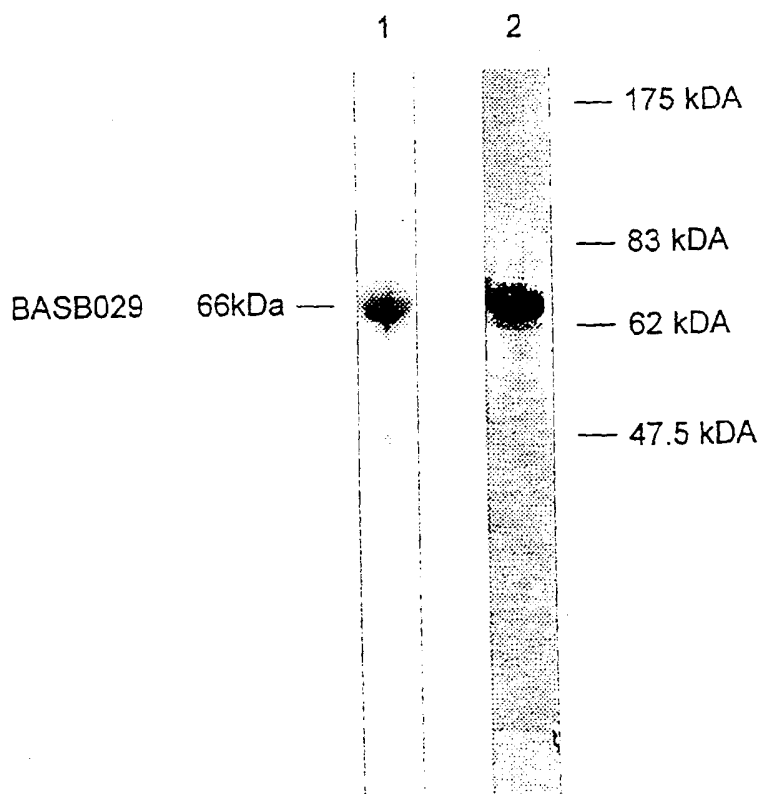
* 520 * 540 *
Seqid2:TNVAQLKGVAQNLNNHIDNV DGNARAGIAQAIATAGLVQAYLPGKSMMAI:546
Seqid4:.....R.....:543

560 * 580 *
Seqid2:GGGTYRGEAGYAIGYSSISDGGNWIIKGTASGNSRGHFGASASVGYQW:594
Seqid4:.....:591

Obr. 3

Expres a purifikace rekombinantního BASB029 v *E.coli*.

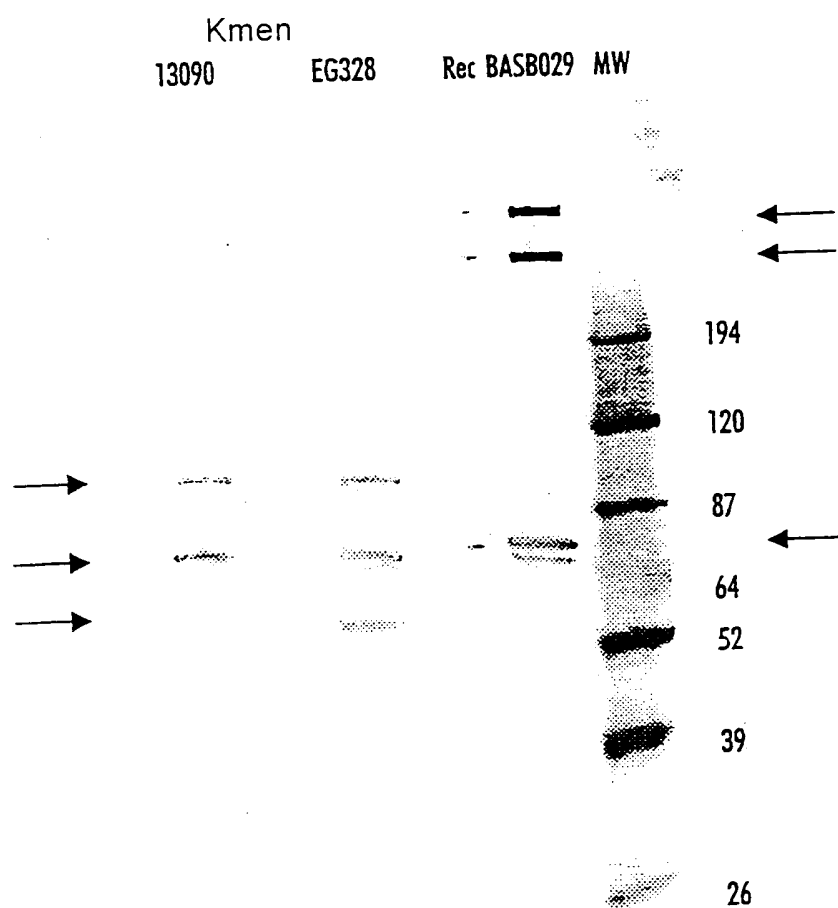
V podstatě vyčištěná proteinová frakce BASB029 (více než 80%) byla dělena na polyakrylamidovém gelu s gradientem 4 až 20 % (Novex) za podmínek PAGE-SDS současně s markery molekulové hmotnosti. Gely byly buď barveny Coomassie Blue R250 (dráha 1) nebo analyzovány westernovým přenosem použitím monoklonální protilátky anti-(His5) (dráha 2).



9/12

Obr. 4

Rozpoznávání proteinu BASB029 u několika kmenů NmB sérem myši imunizovaných BASB029.

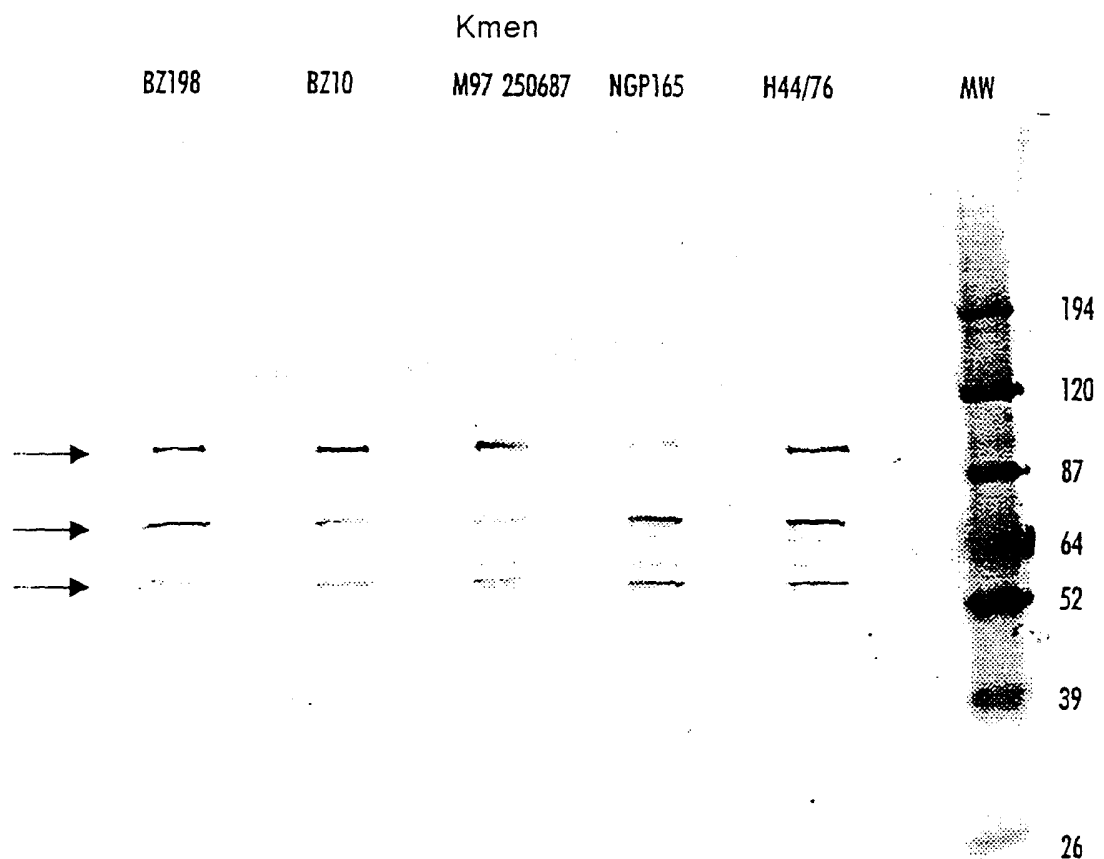


29.01.01

10/12

Obr. 5

Rozpoznávání proteinu BASB029 u několika kmenů NmB sérem myši
imunizovaných BASB029.

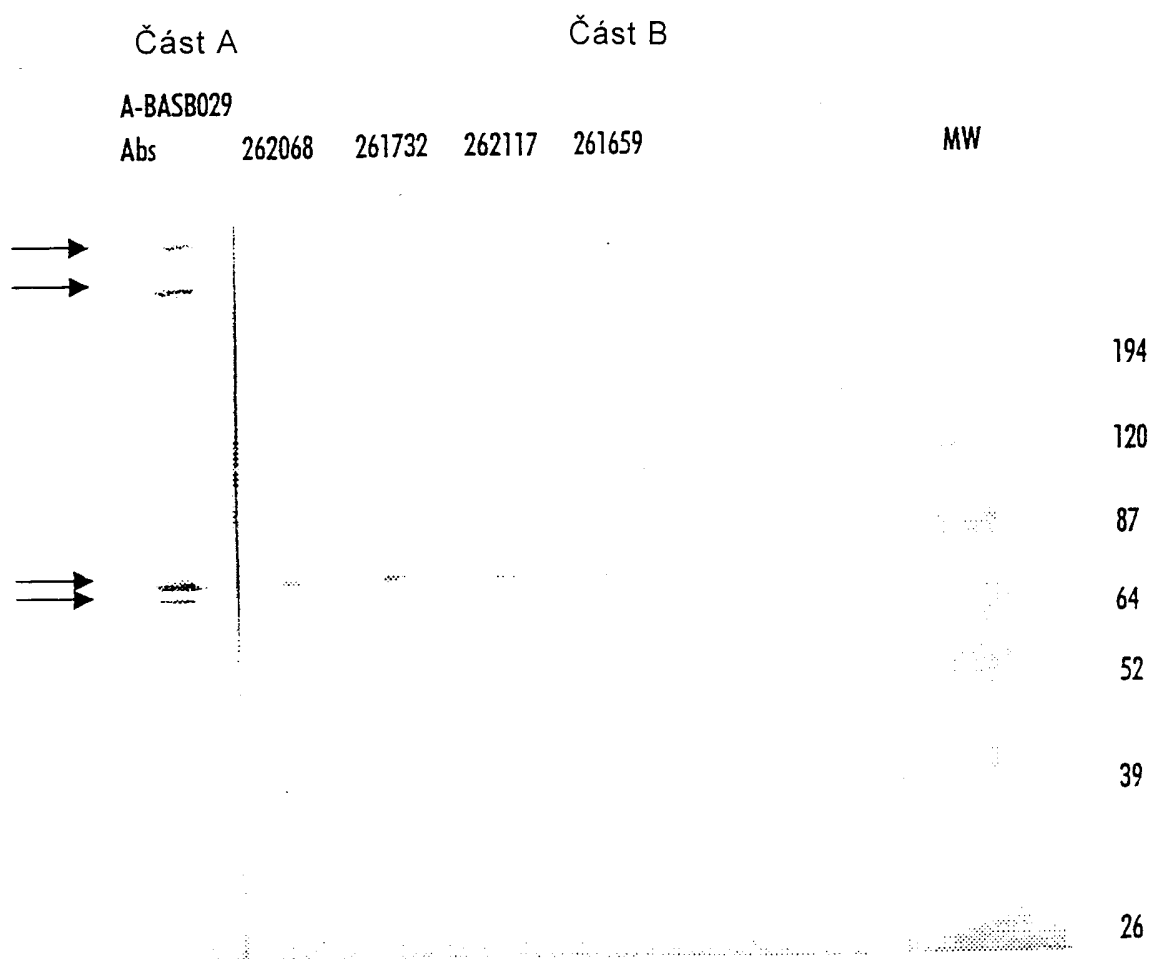


29.01.01

11/12

Obr. 6

Protilátky anti-BASB029 v sérech uzdravených pacientů (část B)
a imunizovaných myší (část A).



12/12

Obr. 7

Protilátky anti-BASB029 v sérech uzdravených pacientů (část B)
a imunizovaných myší (část A).

